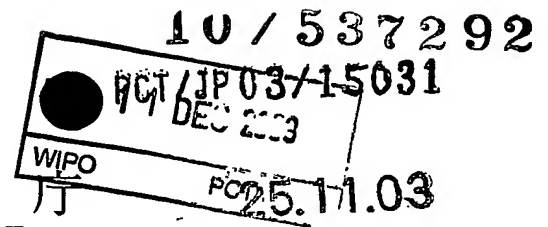


日本国特許
JAPAN PATENT OFFICE



02 JUN 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 5月 8日

出願番号
Application Number: 特願2003-130834
[ST. 10/C]: [JP 2003-130834]

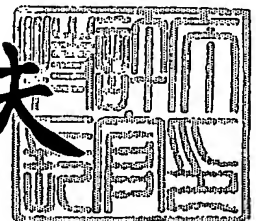
出願人
Applicant(s): 日本電気株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月28日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



Best Available Copy

出証番号 出証特2003-3059694

【書類名】 特許願
【整理番号】 34103772
【提出日】 平成15年 5月 8日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 B01D 57/02

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区芝五丁目 7 番 1 号 日本電気株式会社内

【氏名】 服部 渉

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区芝五丁目 7 番 1 号 日本電気株式会社内

【氏名】 馬場 雅和

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区芝五丁目 7 番 1 号 日本電気株式会社内

【氏名】 佐野 亨

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区芝五丁目 7 番 1 号 日本電気株式会社内

【氏名】 飯田 一浩

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区芝五丁目 7 番 1 号 日本電気株式会社内

【氏名】 川浦 久雄

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区芝五丁目 7 番 1 号 日本電気株式会社内

【氏名】 井口 憲幸

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区芝五丁目 7 番 1 号 日本電気株式会社内

【氏名】 染谷 浩子

【特許出願人】

【識別番号】 000004237

【氏名又は名称】 日本電気株式会社

【代理人】

【識別番号】 100110928

【弁理士】

【氏名又は名称】 速水 進治

【電話番号】 03-5784-4637

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-349492

【出願日】 平成14年12月 2日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 138392

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0110433

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 微粒子操作ユニット、それを搭載したチップと検出装置、ならびにタンパク質の分離、捕獲、および検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 基板と、該基板上に形成された、第一の流路および該第一の流路から分岐する第二の流路を含む流路と、を備え、前記流路内の液体中を流動する微粒子の流動方向を操作する微粒子操作ユニットであって、

前記第一の流路から一以上の前記第二の流路が分岐する分岐点の近傍の前記第一の流路中に、前記微粒子の少なくとも一部に対し透過を制限する透過制限領域を備えることを特徴とする微粒子操作ユニット。

【請求項 2】 請求項 1 に記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記透過制限領域は、離間して配置された複数の妨害体を有することを特徴とする微粒子操作ユニット。

【請求項 3】 請求項 2 に記載の微粒子操作ユニットにおいて、隣接する前記妨害体間の間隙が、前記微粒子の一部を透過する大きさに設定されたことを特徴とする微粒子操作ユニット。

【請求項 4】 請求項 2 または 3 に記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記微粒子の流動を形成する力の方向と、前記透過制限領域の前記分岐点側最前面における前記妨害体の配列方向とが、非直角または非平行となるように前記妨害体が配置されていることを特徴とする微粒子操作ユニット。

【請求項 5】 請求項 2 乃至 4 いずれかに記載の微粒子操作ユニットにおいて、複数の前記妨害体の配列により前記微粒子の流動方向を制御し前記微粒子の少なくとも一部を前記第一の流路または前記第二の流路のいずれかに導くことを特徴とする微粒子操作ユニット。

【請求項 6】 請求項 2 乃至 5 いずれかに記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記妨害体が、平面的に周期的に配置されていることを特徴とする微粒子操作ユニット。

【請求項 7】 基板と、該基板上に形成された、主流路および該主流路から前記主流路の下流側に向かって分岐する一以上の副流路を含む流路と、を備え、

前記流路内を流動する微粒子の流動方向を操作する微粒子操作ユニットであって

前記主流路から一以上の前記副流路が分岐する分岐点の上流側に流動制御部を備え、

前記流動制御部は、前記微粒子の流動方向を制御し前記微粒子の少なくとも一部を前記主流路または前記副流路のいずれかに導くことを特徴とする微粒子操作ユニット。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記流動制御部は複数の妨害体を有し、該複数の妨害体の配列により前記微粒子の流動方向を制御し前記微粒子の少なくとも一部を前記主流路または前記副流路のいずれかに導くことを特徴とする微粒子操作ユニット。

【請求項 9】 請求項 7 または 8 に記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記流動制御部は、周期的に配置された複数の前記妨害体を有することを特徴とする微粒子操作ユニット。

【請求項 10】 請求項 9 に記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記流動制御部における隣接する前記妨害体間の間隙が、前記主流路の形成方向と、前記副流路の形成方向とで異なることを特徴とする微粒子操作ユニット。

【請求項 11】 基板と、該基板上に形成された流路と、を備え、前記流路内を流動する微粒子の流動状態を操作する微粒子操作ユニットであって、前記流路中に、トレンチが流路壁面に形成された流動制御部を有し、前記微粒子の少なくとも一部を所定方向に導くことを特徴とする微粒子操作ユニット。

【請求項 12】 請求項 11 に記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記トレンチが前記流路壁面に周期的に形成された流動制御部を有することを特徴とする微粒子操作ユニット。

【請求項 13】 請求項 12 に記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記流動制御部は、前記トレンチの開口形状または前記トレンチの間隔の異なる複数の周期パターンを含むことを特徴とする微粒子操作ユニット。

【請求項 14】 請求項 13 に記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記複数の周期パターンは、前記流動制御部において鏡映対称に形成されていることを

特徴とする微粒子操作ユニット。

【請求項 1 5】 請求項 1 乃至 1 4 いずれかに記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記微粒子が、高分子樹脂、金属、半導体、または生体分子のいずれかを含むことを特徴とする微粒子操作ユニット。

【請求項 1 6】 請求項 1 乃至 1 5 いずれかに記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記微粒子をその大きさに依存して分離する機能を有することを特徴とする微粒子操作ユニット。

【請求項 1 7】 請求項 1 乃至 1 6 いずれかに記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記流路に微粒子を懸濁した懸濁液が導入され、その懸濁液を希釈する機能を有することを特徴とする微粒子操作ユニット。

【請求項 1 8】 請求項 1 乃至 1 6 いずれかに記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記流路に微粒子を懸濁した懸濁液が導入され、その懸濁液を脱塩する機能を有することを特徴とする微粒子操作ユニット。

【請求項 1 9】 請求項 1 乃至 1 8 いずれかに記載の微粒子操作ユニットを有することを特徴とするチップ。

【請求項 2 0】 請求項 1 9 に記載のチップと、前記微粒子の検出手段とを備えることを特徴とする検出装置。

【請求項 2 1】 請求項 2 0 に記載の検出装置において、前記微粒子の検出手段が質量分析装置により構成されていることを特徴とする検出装置。

【請求項 2 2】 タンパク質を粗分離する工程と、
該工程の後、粗分離されたタンパク質を電気泳動により分離する工程と、を含み、

タンパク質を粗分離する前記工程は、少なくともタンパク質を連続的に分離する機能を有するチップを用いてタンパク質を粗分離する工程を含むことを特徴とするタンパク質の分離方法。

【請求項 2 3】 タンパク質を粗分離する工程と、
該工程の後、粗分離されたタンパク質を電気泳動により分離する工程と、
を含み、
タンパク質を粗分離する前記工程は、請求項 1 9 に記載のチップを用いてタン

パク質を粗分離する工程を含むことを特徴とするタンパク質の分離方法。

【請求項 24】 請求項 22 または 23 に記載のタンパク質分離方法によりタンパク質を分離した後、分離されたタンパク質をプロテアーゼ処理により分解し、さらにその分解生成物を質量分析装置により同定する工程を含むことを特徴とするタンパク質の検出方法。

【請求項 25】 請求項 19 に記載のチップを用いてタンパク質を分離した後、複数のタンパク質を含む懸濁液から、親和性を利用して目的とするタンパク質を捕獲することを特徴とするタンパク質の捕獲方法。

【請求項 26】 請求項 25 に記載のタンパク質の捕獲方法によりタンパク質を捕獲した後、前記チップの表面を洗浄し、さらに前記捕獲したタンパク質を質量分析装置により同定する工程を含むことを特徴とするタンパク質の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、微粒子操作ユニット、それを搭載したチップと検出装置、ならびにタンパク質の分離、捕獲、および検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、マイクロ・エレクトロメカニカル・システム（MEMS）技術の発展により、特にバイオMEMS分野でマイクロ流路を利用した微粒子の処理への応用が試みられている。たとえば、従来高分子ゲルを使用していた電気泳動用の妨害体を微細加工技術で作製した分画装置が提案されている（特許文献1）。これにより、従来の高分子ゲルの調製の手間が無くなる、再現性が向上する等の産業利用上の利点が見出されていた。しかしながら、マイクロ流路を利用した微粒子の処理装置はその処理量が極めて少ないという課題があった。これを解決するために、連続的に微粒子の処理を行う方法が提案されている（特許文献2）。特許文献2記載の技術においては、電気泳動を行うための緩衝液を連続的に流しながら、その流れに対して直角に電界を印加し、緩衝液中の生体分子の泳動を行うこ

とにより、微粒子の一種である生体分子の連続的な分離を実現している。この連続的な処理により、処理時間を長く取る事によって処理量が極めて少ないという制約を排除することができる。

【0003】

一方、妨害体の作製に微細加工技術を利用する試みもなされている（非特許文献1）。非特許文献1に記載の方法では、流れに対して非対称の形状を有する妨害体の規則格子を用いて、連続的に微粒子の分離を行っている。

【0004】

ところが、これらの従来の技術には以下のような課題があった。特許文献2記載の技術においては、ポンプにより緩衝液を流しながら電気泳動を行い、その速度により分離角度が決定されるため、脈動するポンプにより緩衝液の流速が変動し、この流速の変動に分離能が著しく左右されていた。

【0005】

また、非特許文献1に記載のデバイスでは妨害体が固定されているため、特許文献2記載の方法と比較すると、より安定に分離が行える。しかし、妨害体の形状に分離性能が依存しているため、生体分子のように、分子レベルの大きさを有する微細な粒子に対応することが困難であった。例えばタンパク質のように粒径が50 nm以下の微粒子を分離する場合、妨害体の形状にはより高い精度が求められるが、このような微細な形状を精度良く作製することは、現状の微細加工技術では困難であった。

【0006】

【特許文献1】

特表平9-504362号公報

【特許文献2】

特開2002-195982号公報

【非特許文献1】

Chia-Fu Chouら、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (UNITED S

TATES)、1999年、96巻、24号、p. 13762-13765

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、その目的は、マイクロ流路内で液体中の微粒子の流れを操作する微粒子操作ユニット、チップ、およびタンパク質の処理方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明によれば、基板と、該基板上に形成された、第一の流路および該第一の流路から分岐する第二の流路を含む流路と、を備え、前記流路内の液体中を流動する微粒子の流動方向を操作する微粒子操作ユニットであって、前記第一の流路から一以上の前記第二の流路が分岐する分岐点近傍の前記第一の流路中に、前記微粒子の少なくとも一部に対し透過を制限する透過制限領域を備えることを特徴とする微粒子操作ユニットが提供される。

【0009】

本発明において、「微粒子」とは、ミクロンオーダー以下の大きさを有する分子またはその集合体、あるいは原子の集合体であって、たとえば金属微粒子、半導体微粒子、高分子樹脂、生体高分子等を含む。このうち生体高分子には、タンパク質、核酸、多糖、脂質およびこれらの複合体を含む。また、「微粒子の操作」とは、主として流路内における微粒子の流れの方向や経路を調節する操作をいう。微粒子の流れを制御することにより、分離、濃縮、希釈、脱塩、溶媒置換等様々な処理が可能となる。

【0010】

本発明に係る微粒子操作ユニットは、流路中に制限透過領域を備える。このため、第一の流路と第二の流路とが分岐する分岐点よりも下流側への微粒子の移動を制限することができる。第一の流路から透過制限領域に至った液体中の微粒子のうち、所定の形状、大きさの微粒子のみが透過制限領域を透過し、第一の流路の下流側へと導かれる。また、液体中に含まれる微粒子のうち、特定の微粒子、すなわち透過制限領域を透過することができない微粒子の流動方向を操作し、こ

のような粒子のみを第二の流路へと導くことが可能となる。このように、本発明に係る微粒子操作ユニットによれば、液体中の微粒子の流れる方向を簡便に効率よく制御することが可能となる。

【0011】

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記透過制限領域は、離間して配置された複数の妨害体を有する構成とすることができる。この構成により、妨害体の間隙を透過することが可能な微粒子と不可能な微粒子とを、微粒子の表面の性質や形状、大きさ、変形のしやすさ等に基づいて分離することができる。

【0012】

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、隣接妨害体間の間隙が、前記微粒子の一部を透過する大きさに設定された構成とすることができる。この構成により、第一の流路中の液体に含まれる微粒子を、その形状、大きさに基づき確実に分離することが可能となる。

【0013】

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記微粒子の流動を形成する力の方向と、前記透過制限領域の前記分岐点側の最前面における前記妨害体の配列方向とが、非直角または非平行となるように前記妨害体が配置された構成とすることができる。ここで、「透過制限領域の分岐点側の最前面における妨害体の配列方向」とは、第一の流路の下流側から妨害体の配列を見た際に、最前面に位置する妨害体を結ぶ方向を指す。この配列方向と、微粒子の流動を形成する力の方向を非直角とすることにより、透過制限領域を透過することができない微粒子が、透過制限領域近傍に堆積することを抑制し、効率よく第二の流路中へと導くことができる。また、非平行とすることにより、液体中の微粒子のうち、透過制限領域を通過できる形状、大きさ等を有する微粒子について、確実に透過制限領域を通過させることができる。

【0014】

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記複数の妨害体の配列により前記微粒子の流動方向を制御し前記微粒子の少なくとも一部を前記第一の流路または前記第二の流路のいずれかに導く構成とすることができる。この構成により、複数

の妨害体の配列を利用して微粒子を所定の流路に導くことができる。従って、第一の流路に導かれる微粒子と第二の流路に導かれる微粒子とを確実に分離することができる。

【0015】

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記妨害体が、平面的に周期的に配置されている構成とすることができる。この構成により、より一層精度の高い処理が可能となる。

【0016】

本発明によれば、基板と、該基板上に形成された、主流路および該主流路から前記主流路の下流側に向かって分岐する一以上の副流路を含む流路と、を備え、前記流路内を流動する微粒子の流動方向を操作する微粒子操作ユニットであって、前記主流路から一以上の前記副流路が分岐する分岐点の上流側に流動制御部を備え、前記流動制御部は、前記微粒子の流動方向を制御し前記微粒子の少なくとも一部を前記主流路または前記副流路のいずれかに導くことを特徴とする微粒子操作ユニットが提供される。

【0017】

本発明に係る微粒子操作ユニットによれば、主流路から副流路が分岐する分岐点の上流側に流動制御部が形成されているため、分岐点に導入された微粒子をその表面の性質、形状、大きさ、変形のしやすさ、等に基づいていずれかの副流路に誘導することができる。したがって、複数の微粒子を含む液体中の各成分を所望の副流路に分配することが可能となる。

【0018】

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記流動制御部は複数の妨害体を有し、該複数の妨害体の配列により前記微粒子の流動方向を制御し前記微粒子の少なくとも一部を前記主流路または前記副流路のいずれかに導く構成とすることができる。この構成により、複数の妨害体の配列を利用して微粒子を所定の流路に導くことができる。従って、主流路に導かれる微粒子と副流路に導かれる微粒子とを確実に分離することができる。

【0019】

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記流動制御部は、周期的に配置された複数の妨害体を有する構成とすることができる。この構成により、妨害体の間隙を透過することが可能な微粒子と不可能な微粒子とを、微粒子の表面の性質や形状、大きさ、変形のしやすさ等に基づいて分離することができる。

【0020】

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記流動制御部における隣接妨害体間の間隙が、前記主流路の形成方向と、前記副流路の形成方向とで異なる構成とすることができる。ここで、主流路または副流路の形成方向についての「隣接妨害体間の間隙」とは、流路の形成方向に対して垂直な断面における妨害体間の間隙のことを指す。主流路と副流路とでこの間隙が異なる構成とすることにより、流動制御部中の微粒子の形状、大きさ等に基づき確実に各副流路または主流路へと分配させることができる。

【0021】

本発明によれば、基板と、該基板上に形成された流路と、を備え、前記流路内を流動する微粒子の流動状態を操作する微粒子操作ユニットであって、前記流路中に、トレンチが流路壁面に形成された流動制御部を有し、前記微粒子の少なくとも一部を所定の方向に導くことを特徴とする微粒子操作ユニットが提供される。

【0022】

本発明に係る微粒子操作ユニットによれば、流動制御部にトレンチが形成されているため、トレンチの形状や形成方向に基づき、流路中の液体に含まれる微粒子のうち、トレンチと相互作用することができる微粒子をトレンチとの相互作用の大小に従って選択的に所望の方向に誘導することが可能となる。したがって、複数の微粒子を含む液体中の特定の成分について、分離、濃縮等の所定の処理を行うことができる。

【0023】

本発明に係る微粒子操作ユニットにおいて、前記トレンチが流路壁面に周期的に形成された流動制御部を有する構成とすることができる。この構成により、トレンチの配列を利用してより一層確実に微粒子の流動を制御することができる。

【0 0 2 4】

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記流動制御部は、前記トレンチの開口形状または前記トレンチの間隔の異なる複数の周期パターンを含む構成とすることができる。この構成により、微粒子の流動をより一層精密に制御することができる。

【0 0 2 5】

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記複数の周期パターンは、前記流動制御部において鏡映対称に形成された構成とすることができる。この構成により、液体中の所定の微粒子を、流路中の特定領域に濃縮することが可能となる。

【0 0 2 6】

本発明において、前記微粒子は、高分子樹脂、金属、半導体、または生体分子のいずれかを含むものとすることができる。

【0 0 2 7】

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記微粒子をその大きさに依存して分離する機能を有する構成とすることができる。

【0 0 2 8】

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記流路に微粒子を懸濁した懸濁液が導入され、その懸濁液を希釈する機能を有する構成とすることができる。

【0 0 2 9】

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記流路に微粒子を懸濁した懸濁液が導入され、その懸濁液を脱塩する機能を有する構成とすることができる。

【0 0 3 0】

本発明によれば、前記微粒子操作ユニットを有することを特徴とするチップが提供される。本発明に係るチップは、微粒子の流れを操作し、分離、濃縮、希釈、脱塩、溶媒置換等の機能を有する。たとえば、本発明に係るチップにおいて、微粒子操作ユニットが第一の流路および第一の流路から分岐する第二の流路を含む流路を有し、第一の流路から一以上の前記第二の流路が分岐する分岐点の近傍の第一の流路中に、微粒子の少なくとも一部に対し透過を制限する透過制限領域を備えた構成とすることができる。このような構成である場合、第一の流路中の

微粒子は、透過制限領域を経由して、第一の流路および第二の流路に分離され、これをもって微粒子の流動方向が操作されている。このような構成の微粒子操作ユニットを有するチップにおいて、透過制限領域よりも上流側に、第一の流路と連通する試料導入部を有してもよい。また、他の流路から微粒子を含む試料を導入することも可能である。一方、透過制限領域よりも上流側には、第一の流路または第二の流路と連通する試料排出部を有していてもよいし、試料回収部を有していてもよい。

【0031】

また本発明によれば、このチップと、前記微粒子の検出手段とを備える検出装置が提供される。

【0032】

この検出装置において、前記微粒子の検出手段が質量分析装置により構成されている構成とすることができる。

【0033】

本発明によれば、タンパク質を粗分離する工程と、該工程の後、粗分離されたタンパク質を電気泳動により分離する工程と、を含み、タンパク質を粗分離する前記工程は、少なくともタンパク質を連続的に分離する機能を有するチップを用いてタンパク質を粗分離する工程を含むことを特徴とするタンパク質の分離方法が提供される。

【0034】

また、本発明によれば、タンパク質を粗分離する工程と、該工程の後、粗分離されたタンパク質を電気泳動により分離する工程と、を含み、タンパク質を粗分離する前記工程は、前記チップを用いてタンパク質を粗分離する工程を含むことを特徴とするタンパク質の分離方法が提供される。

【0035】

さらに、本発明によれば、前記タンパク質分離方法によりタンパク質を分離した後、分離されたタンパク質をプロテアーゼ処理により分解し、さらにその分解生成物を質量分析装置により同定する工程を含むタンパク質の検出方法が提供される。

【0036】

また本発明によれば、本発明のチップを用いてタンパク質を分離した後、複数のタンパク質を含む懸濁液から、親和性を利用して目的とするタンパク質を捕獲するタンパク質の捕獲方法が提供される。

【0037】

さらに、このタンパク質の捕獲方法によりタンパク質を捕獲した後、前記チップの表面を洗浄する工程を有し、さらに前記捕獲したタンパク質を質量分析装置により同定する工程を含むタンパク質の検出方法が提供される。

【0038】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態の例について図面を参照しながら説明する。

【0039】

(第一の実施形態)

本実施形態は、流路に形成された妨害体によって試料液体中に含まれる微粒子の流れを操作し、所定の方向に導く微粒子操作ユニットに関する。図1は本実施形態に係る微粒子操作ユニットの構成の一例を示す斜視図である。図1に示されるように、基板41上に形成された流路1が分岐点43において流路2と流路3とに分岐する構成であり、流路1と流路2、および流路3の分岐点には一定の間隙を設けて配列された複数の柱状構造の妨害体8からなる妨害部が設けられている。

【0040】

まず、流路1の上流に微粒子4を含む懸濁液を充填する。この懸濁液は、流路1では矢印5の、流路2では矢印6の、流路3では矢印7の方向にそれぞれ流れる。この際、懸濁液を流すための外力の付与方法として、たとえば流路1の上流あるいは流路2と流路3の下流にポンプを設置することができる。また、毛細管現象を利用してもよい、毛細管現象を利用すれば、ポンプ等の外力付与装置が不要となり、装置全体を小型、簡略化することができる。またその他、懸濁液の流れを生じせしめる機構であればその種類に制限はない。この懸濁液の流れは微粒子4に作用し、微粒子4を流す力ともなる。また、液体を流すことなく、電気泳

動や誘電泳動により微粒子4のみを泳動させてもよい。たとえば流路1、流路2および流路3にそれぞれ電極（不図示）を形成しておき、各電極間に電圧を印加すれば、微粒子4が電荷を有する場合、電極に向かって効率よく誘導される。

【0041】

図1の微粒子操作ユニットにおいて、分岐点43では、懸濁液中の成分のうち妨害体8の間隙を通過できる成分のみが流路2へと流れ、通過できない成分は流路3に流れる。図2は、分岐点に設けられた妨害体8と、分岐点43の上流に存在する微粒子4を示す上面図である。以下、微粒子4の流れる方向が妨害体によって操作される機構を、図2を用いて説明する。なお、本明細書において、粒子の変形のしやすさを考慮した粒径を、「実効的な粒径」と呼ぶ。

【0042】

図2に示すように、複数の妨害体8間の間隙の幅 a が、溶媒中での変形のしやすさを考慮した微粒子4の実効的な粒径 b よりも狭い場合、微粒子4が間隙を通過しようとする際に受ける抵抗により、流路3の方向に微粒子4が通過する確率と比較して流路2の方向に通過する確率は小さくなる。また、この構造のうち隣接する妨害体8を結ぶ線分、例えば線分9は微粒子4に作用する力の方向10に対してある傾きを持って配置されている。すなわち角度11について、 $0^\circ < \text{角度}11 < 90^\circ$ が成り立つ。角度11が 0° の場合には、懸濁液全体が流路3のみに流れ、流路2に流れる成分がなくなってしまうからである。また、角度11が 90° の場合には、微粒子4が流路3に流れずに妨害体8の間隙に挟まって留まってしまい、妨害体8付近に堆積してしまうからである。なお、力の方向10は矢印5、6、および7で表される力の合力の方向を表している。微粒子4は液体中でブラウン運動しているため、 $0^\circ < \text{角度}11 < 90^\circ$ であれば妨害体8間の間隙に挟まって留まるのではなく、平均的には徐々に流路3の方向に流れていく。

【0043】

たとえば、懸濁液として血液を考え、微粒子4として赤血球を考えた場合、複数の妨害体8間の間隙の幅 a を $3\mu\text{m}$ 程度とすることができる。こうすれば、懸濁液としての血液を、流路1の上流より毛細管現象を利用して流した場合に、分

岐点 43 にて赤血球は血漿とともに流路 3 の方向に流れ、流路 2 には血漿のみ流れる。したがって、遠心分離装置を用いることなく血液から血漿を分離できる。この際、抽出用のバッファ等を用いないため、血漿の濃度が変化することはない。また、この場合、赤血球の破壊を防ぐためには、妨害体 8 から受ける抵抗をなるべく小さくすることが望ましいため、角度 11 をなるべく小さくすることが望ましい。また、赤血球にかかる力は毛細管現象による血液の流れる力にも関わるため、流路 2 と流路 3 の断面積の比を考慮することが望ましく、赤血球の破壊を防ぐためには流路 3 の断面積を相対的に大きくすることが望ましい。

【0044】

このように、本実施形態では、液体で満たされた流路 1 において微粒子 4 を流しながらその流れを操作するユニットが構成される。また、この流れの操作においては、微粒子 4 を連続的に流すことが可能である。このため、比較的大量の試料を連続的に処理することが可能となる。

【0045】

また、従来、例えば前述の非特許文献 1 に記載の方法に従ってタンパク質のように 50 nm 以下の粒径を有する微粒子の流れを操作するためには、妨害体 8 の形状に求められる精度は高く、複雑な形状の妨害体を微細加工技術で作製するのは困難であった。これに対し、本実施形態によると、微粒子 4 の流れは複数の妨害体 8 の間の間隙によって制御され、妨害体 8 の形状にほとんど影響されない。このため、妨害体 8 の形状に求められる精度が微粒子の粒径と比較してさらに小さなオーダーとなることはない。即ち、通常行われる微細加工で容易に作製可能な断面が円形の柱状構造を採用しても、微粒子 4 の流れを高い精度で制御することが可能となる。従って、本実施形態の微粒子操作ユニットは、微細な粒子に対応して容易に作製可能であり、連続的に微粒子 4 の流れの操作を行うことができる。

【0046】

基板 41 の材料としては、シリコンを用いる。シリコン表面にはシリコン酸化膜を形成することが好ましい。このシリコン酸化膜により、基板 41 の表面が親水性を有することとなり、試料流路を好適に形成することが可能となる。なお、

基板 41 の材料として石英等のガラスや、プラスチック材料等を用いてもよい。プラスチック材料として、たとえばシリコン樹脂、PMMA（ポリメタクリル酸メチル）、PET（ポリエチレンテレフタレート）、PC（ポリカーボネート）等の熱可塑性樹脂や、エポキシ樹脂などの熱硬化性樹脂等が挙げられる。このような材料は成形加工が容易なため、製造コストを抑えることができる。さらに、基板 41 に金属を用いてもよい。

【0047】

妨害体 8 は、たとえば、基板 41 を所定のパターン形状にエッチングすることにより形成することができるが、その作製方法には特に制限はない。

【0048】

また、図 1 の妨害体 8 は円柱であるが、円柱、楕円柱等の擬円柱に限らず、円錐、楕円錐等の錐体；

三角柱、四角柱等の多角柱；

その他の断面形状を有する柱体；

等としてもよい。但し、微粒子の流れを高精度に制御するためには、錐体より柱体が好ましい。

【0049】

さらに、妨害体 8 にかわり、複数の開口部を有する板状の隔壁を形成してもよい。このとき、隔壁に形成する開口部の形状は、円形、楕円形、多角形、の孔やスリット等、微粒子 4 の形状、大きさに応じて適宜選択される。

【0050】

妨害体 8 のサイズは、例えば、幅は $10\text{ nm} \sim 10\text{ }\mu\text{ m}$ 程度とする。また、隣接する妨害体 8 の間隔は、微粒子 4 の形状、大きさに応じて適宜選択されるが、たとえば、 $5\text{ nm} \sim 10\text{ }\mu\text{ m}$ とする。また、高さは図 1 では流路 1 の深さと同程度となっている。

【0051】

また、基板 41 の表面に被覆を形成してもよい。被覆を設けることにより、流路 1、2、および 3 中の試料液体の乾燥等が抑制される。被覆の材料としては、たとえば基板 41 と同様の材料の中から選択することができる。基板 41 と同種

の材料を用いてもよいし、異なる材料としてもよい。

【0052】

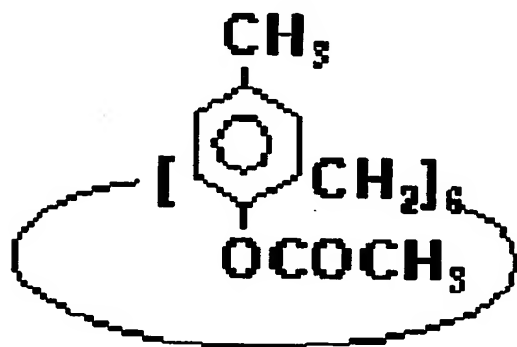
次に図1の微粒子操作ユニットの製造方法について説明する。基板41上への流路1、2、および3、および妨害体8の形成は、基板41を所定のパターン形状にエッチング等を行うことができるが、その作製方法には特に制限はない。

【0053】

たとえば、微細加工用レジストのカリックスアレーンを用いた電子線露光技術を利用して作製することが可能である。カリックスアレーンの分子構造の一例を以下に示す。カリックスアレーンは電子線露光用のネガレジストとして用いられ、ナノメートルスケールの微細加工用のレジストとして好適に利用することができる。

【0054】

【化1】



【0055】

ここでは、基板41として面方位が(100)のシリコン基板を用いる。まず、基板41上にシリコン酸化膜、カリックスアレーン電子ビームネガレジスト膜をこの順で形成する。シリコン酸化膜、カリックスアレーン電子線露光用ネガレジスト膜の膜厚は、それぞれ40nm、55nmとする。次に、電子線露光装置を用い、妨害体8となる領域を電子線露光する。現像はキシレンを用いて行い、イソプロピルアルコールによりリンスする。この工程により、カリックスアレーン電子線露光用ネガレジストがパターンニングされる。

【0056】

つづいて全面にポジフォトレジストを塗布する。膜厚は $1.8\mu\text{m}$ とする。この際、電子線露光され、現像工程を経て残ったカリックスアレーンレジストはポジフォトレジストの溶媒に溶解しない。その後、流路1、2、および3となる領域が露光するようにマスク露光をし、現像を行う。この工程により、カリックスアレーンとポジフォトレジストによるレジストマスクが形成される。

【0057】

次に、レジストマスクを用いてシリコン酸化膜を CF_4 、 CHF_3 の混合ガスを用いてドライエッチング除去する。残ったポジフォトレジストをアセトン、アルコール、水の混合液を用いた有機洗浄により除去した後、更に残ったポジフォトレジストとカリックスアレーンレジストを酸化プラズマ処理により除去する。つづいて、レジストパターンを転写したシリコン酸化膜をマスクとして、シリコン基板を HBr ガスにより $2\mu\text{m}$ ドライエッチングする。つづいてバッファードフッ酸水溶液でウェットエッチングを行い、シリコン酸化膜を除去する。以上により、基板41上に流路1、2、および3、および妨害体8が形成される。

【0058】

ここで、以上の工程に次いで、基板41表面の親水化を行うことが好ましい。基板41表面を親水化することにより、流路1、2、および3や妨害体8に試料液体が円滑に導入される。特に、妨害体8により流路が微細化した分岐点43においては各流路の表面を親水化することにより、試料液体の毛細管現象による導入が促進され、流れの操作精度が向上する。

【0059】

そこで、たとえばエッチング工程の後、基板41を酸化炉に入れてシリコン熱酸化膜を形成する。このとき、たとえばシリコン熱酸化膜の膜厚が 30nm となるように熱処理条件を選択する。またこの場合には、予めこの酸化膜厚を考慮して妨害体8の配列を設計する。シリコン熱酸化膜を形成することにより、分離装置内に液体を導入する際の困難を解消することができる。その後、被覆を設ける場合は静電接合を行い、シーリングして微粒子操作ユニットを完成する。

【0060】

また、基板41にプラスチック材料を用いる場合、エッチングやエンボス成形

等の金型を用いたプレス成形、射出成形、光硬化による形成等、基板 41 の材料の種類に適した公知の方法で行うことができる。

【0061】

基板 41 にプラスチック材料を用いる場合にも、基板 41 表面の親水化を行うことが好ましい。基板 41 の表面を親水化することにより、流路や妨害体 8 の形成された領域に試料液体が円滑に導入される。特に、妨害体 8 により流路が微細化した分岐点 43 においては、基板 41 の表面を親水化することにより、試料液体の毛細管現象による液体の導入が促進されるため好ましい。

【0062】

親水性を付与するための表面処理としては、たとえば、親水基をもつカップリング剤を流路の側壁に塗布することができる。親水基をもつカップリング剤としては、たとえばアミノ基を有するシランカップリング剤が挙げられ、具体的には N- β (アミノエチル) γ -アミノプロピルメチルジメトキシシラン、N- β (アミノエチル) γ -アミノプロピルトリメトキシシラン、N- β (アミノエチル) γ -アミノプロピルトリエトキシシラン、 γ -アミノプロピルトリメトキシシラン、 γ -アミノプロピルトリエトキシシラン、N-フェニル- γ -アミノプロピルトリメトキシシラン等が例示される。これらのカップリング剤は、スピコート法、スプレー法、ディップ法、気相法等により塗布することができる。

【0063】

なお、図 1 の微粒子操作ユニットでは、流路 1 と流路 2 とを含む第一の流路と、分岐点 43 において第一の流路から分離する流路 3、すなわち第二の流路とを有する構成とした。図 1 では、流路 1 と流路 2 との形成方向は一致しており、流路 1 および流路 2 に対し、流路 3 は所定の角度をもっているが、流路 1 と流路 2 とが所定の角度をなしていてもよい。

【0064】

(第二の実施形態)

本実施形態は、流路に形成された妨害体によって試料液体中に含まれる微粒子の流れを操作し、所定の方向に導く微粒子操作ユニットに関する。第一の実施形態と異なる点は、複数段の妨害部が形成された領域を有する点である。図 3 は本

実施形態に係る微粒子操作ユニットの構成の一例を示す斜視図である。

【0065】

図4は、分岐点43に設けられた妨害体8と、分岐点43の上流に存在する微粒子4を示す上面図である。以下図4を用いて、微粒子4の流れる方向が妨害体によって操作される機構を説明する。図4に示されるように、複数段になった妨害体8の配列構造は、一点鎖線で示した単位胞12を形成している。この単位胞12中の間隙の幅においては、図4に示したとおり、試料液体中での変形のしやすさを考慮した微粒子4の実効的な粒径 b と比較して間隙の幅 a は小さく、幅 c は大きく設定されている。すなわち $a < b < c$ である。従って、粒子4は方向10の方向に合力を受けて流れていこうとするが、間隙の幅 a が小さいため、幅 a を横切る方向に妨害体8の配列を移動できる確率は低く、ブラウン運動により妨害体8と衝突を繰り返しながら、その多くは流路3の方向に流れていくことになる。

【0066】

本実施形態の場合、妨害体8の配列構造が合力の方向10に対して複数段設けられている部分がある。微粒子4がDNAやタンパク質のような生体高分子等、ある程度変形する粒子の場合には、このように複数段の配列構造を設けることにより、幅 a を横切る方向に妨害体8の配列中を移動する確率を更に低くすることができる。但し、本実施形態の微粒子操作ユニットによって流れを操作される微粒子は、生体分子に限られるわけではなく、例えば抗体を付着させたポリスチレンビーズや金微粒子、あるいは半導体量子ドットのように高分子樹脂、金属、または半導体であっても適用でき、連続的に微粒子の流れの操作を行うことができる。

【0067】

また本実施の形態で操作する試料液体には、図に示されるように、試料が微粒子4の他に更に小さい微粒子13を含んでいてもよい。試料液体中での微粒子13の実効的な粒径 d は妨害体8間の間隙の幅 a より小さい。すなわち、 $d < a < b < c$ である。従って、微粒子13については、幅 a を横切る方向に妨害体8の配列中を移動できる確率は十分大きい。即ち、微粒子4と微粒子13を含む懸濁

液を試料液体として流路 1 の上流から流すことにより、流路 2 では微粒子 4 を含まない液体を取り出すことができる。従って、本実施形態に係る微粒子操作ユニットは、微粒子 4 および 13 をその大きさに依存して平面的に分離する機能を有している。なお、本実施の形態では流路 3 にも微粒子 13 が流れ込むが、微粒子を流す力を加減すると共に流路の分岐点の構造を工夫することにより、流路 3 に流れ込む微粒子 13 の量を十分少なく抑えることも可能である。

【0068】

図 11 は、本実施形態に係る微粒子操作ユニットの分岐点に設けられた妨害体の構成を示す斜視図である。図 11 の微粒子操作ユニットについては後述するが、この構成では流路 2 および流路 3 の交差部の流路壁の角部を除去し、流路拡張部 45 を形成している。そして、流路拡張部 45 にも妨害体 8 を形成することにより、妨害体 8 の配列の長さを増すことが可能となるため、より一層精度、効率よく微粒子の流れを操作することができる。

【0069】

なお、本実施形態に係る微粒子操作ユニットに用いる材料および製造方法は、たとえば第一の実施形態に記載の材料、方法を用いることができる。本実施形態の微粒子操作ユニットは、妨害体 8 が複数段形成されているが、妨害体の形状自体は微細加工技術を用いて容易に作製することが可能であり、微粒子の流れをさらに精度良く制御することが可能な構成である。

【0070】

(第三の実施形態)

本実施形態は、流路内の壁面に所定の大きさの微粒子と相互作用可能なトレンチ構造を単位胞とする妨害体の配列構造の形成された、微粒子の流れを操作するユニットに関する。図 5 は本実施形態に係る微粒子操作ユニットの一例を示す斜視図である。図 5 に示す通り、基板 47 上に流路 14 が形成されている。流路 14 の上流には微粒子 15 を懸濁させた試料液体が充填される。この微粒子 15 は図 5 中に示した矢印 16 の方向に流れる。第一の実施形態と同様に微粒子 15 を矢印 16 の方向に流す力は電気泳動や誘電泳動等の方法で生じさせても良いし、微粒子 15 に作用する力であればこれらに限らない。

【0071】

図5に示した通り、流路14内には、トレンチ構造17を単位胞とする配列構造が流路底面に形成されている。なお本実施形態では流路14の底面にトレンチ構造17が形成されているが、流路14における他の壁面でもかまわない。トレンチ構造17からなる配列構造の一部分を上面図で示したのが図6である。図6に示されるように、一点鎖線18で囲まれたトレンチ構造17からなる単位胞により配列構造が形成されている。この配列構造中にはトレンチ構造17aとその鏡映対称になるトレンチ構造17bの2種類の配列構造を、一点鎖線19を境界にして含んでいる。

【0072】

このようなトレンチ構造は半導体微細加工技術やMEMS技術で作製できる。また、例えばタンパク質のように50nm以下の粒径の微粒子の流れを操作する場合には、自己組織的に形成できる多孔性材料を用いて形成することもできる。多孔性材料としてはシリカやジルコニア等のメソポーラス構造が良く知られており、有機高分子膜をテンプレートにすることにより、配列構造を形成できる。また、陽極酸化アルミナは自己組織的にトレンチ構造の配列構造をアルミ膜の陽極酸化により形成するが、さらに、ナノインプリント法等を用いて陽極酸化前にアルミ膜に核形成点となる傷を予め作製し、その後陽極酸化することにより、図6に示したような規則構造を作製することが可能である。

【0073】

なお、図5の微粒子操作ユニットでは、流路14の底面に設けられたトレンチ構造17の径と単位胞の周期が共に二次元平面的に方向により異なるが、どちらか一方のみでも良い。また、図5においてはトレンチ構造17が楕円形の場合を例示しているが、楕円形に限定されるものではない。流路14底面に設けられた楕円形をした孔の長径eと短径fは微粒子15と十分相互作用するために微粒子15の粒径gに近いことが望ましい。楕円形のようにトレンチ構造17の径が二次元平面上で異なる場合にはその差異により微粒子15との相互作用に対しても二次元平面的な差異が生じる。またトレンチ構造17の周期が二次元平面上で異なる場合には微粒子15が流れる間にトレンチ構造17から相互作用を受ける頻

度が二次元的に方向によって異なってくる。

【0074】

以上のように、妨害体をトレンチ構造17とした場合にも、微粒子15の流れを操作する微粒子操作ユニットを実現できる。このとき、トレンチ構造17が微粒子15の流れに対する抵抗となり、抵抗の大きさは微粒子15の大きさに依存する。このため、トレンチ構造17と微粒子15との相互作用の程度は微粒子15の形状、大きさによって異なることを利用して、試料中の特定の微粒子について分離、濃縮等の処理を施すことが可能となる。なお、この微粒子15の操作の原因となる相互作用は第一または第二の実施形態のように柱状の妨害体の配列による相互作用より一般的に弱いため、微粒子15の流れる方向に沿って複数段設けることが望ましい。また図5においては、微粒子15の流れを形成する力の矢印16に対してトレンチ構造17の長軸方向と短軸方向が平行でも垂直でも無い配列構造を取っている。これにより、効果的に流路14内において微粒子15の流れを左右に操作することができる。

【0075】

本実施形態の場合には、さらに配列構造に鏡映対称性を持たせていることにより、微粒子15が流れるうちにその境界を示している一点鎖線19近傍に集まってくる。このため、微粒子15の濃縮効果を有する。なお、本実施の形態においては、一点鎖線19と矢印16が平行になっているが、平行でないトレンチ構造を形成することもできる。またトレンチ構造17の配列は鏡映対称な配列には限定されず、流路14の分岐の有無等の構成に対応して所望の配列を選択することが可能である。

【0076】

また、本実施形態に係る微粒子操作ユニットの下流側に、直進する流路と、当該流路に分岐する流路とを設けておけば、たとえば一種の微粒子が分散する分散液を流した際に、直進する流路には分離、濃縮された微粒子が流出し、分岐する流路には分散溶媒のみを回収することができる。

【0077】

(第四の実施形態)

本実施形態に係る微粒子操作ユニットは、平面的に配列された妨害体を有し、試料液体の希釈、脱塩、溶媒置換等を行うものである。図7は、本実施形態に係る微粒子の流れを操作する微粒子操作ユニットの構成を示す上面図である。図7の微粒子操作ユニットにおいては、基板（不図示）上に形成された流路20に流路21および流路23が接続しており、その接続点よりも下流側に、流路22、流路24、および流路25の3本の流路が分岐する分岐点が形成されている。そしてこの分岐点および分岐点および上流側に妨害体が形成されている。すなわち、図7では、流路の接続点近傍から分岐点近傍に至る領域に、妨害体が形成されている。

【0078】

今、流路20を、微粒子26を含む試料懸濁液または緩衝液を分岐点に向かって流すための流路とする。また、流路21および流路23を、希釈用の緩衝液または脱塩用の洗浄液、あるいは置換用の溶媒を分岐点に向かって注入するための流路とする。流路22と24は廃液を分岐点から抽出する流路である。流路25は微粒子26を含む希釈、脱塩、または置換された液体を抽出する流路である。分岐点への各流路の接続領域に示した矢印27～32は各流路の接続領域における液体の流れる方向を示している。分岐点となる領域には間隙を挟んだ複数の柱状構造の妨害体33が鏡映対称性を持って図7に示した通り配置されている。

【0079】

ここで、複数の妨害体33の間の間隙の幅 h 、 i および j は微粒子の粒径 k と比較して $j > h > k > i$ となっている。従って、微粒子26は幅 i を横切る方向には妨害体33の配列を通過しにくく、幅 h と j を横切る方向には通過しやすい。その結果、微粒子26は流路20から流路25に選択的に導かれ通過し易く、流路22と流路24に流出しにくいため、流路25に選択的に排出されることになる。

【0080】

一方、希釈用の緩衝液または脱塩用の洗浄液、あるいは置換用の溶媒は充分分子サイズが小さいため妨害体33の間の間隙の幅に依存せずに分岐点にて混合し、流路22、流路24、および流路25から排出される。従って図7の微粒子操

作ユニットを用いることにより、液体を希釈する機能や、緩衝液を脱塩する機能、あるいは溶媒を置換する機能を実現できる。

【0081】

本実施形態に係る微粒子操作ユニットに用いる材料および製造方法には、たとえば第一の実施形態に記載の材料、方法を用いることができる。

【0082】

なお、以上の各実施形態に示した各々分離、濃縮、希釈、脱塩、溶媒置換等の機能を実現する微粒子操作ユニットは各々単独で使用することもできるし、組み合わせて使用することもできる。組み合わせて使用する場合には同一基板上に集積化することにより、安価に製造できる。また、同一基板上に集積化したチップ上で所望とする処理を連続的に行えば、各ユニットを単独で使用する場合と比較してユニット間での試料の損失を抑制できる。さらにこのようなチップを試料成分の分析装置、検出装置等に搭載し、微粒子処理システムを構成した場合にも、微粒子操作ユニットにおける上述の利点は有用である。このような微粒子処理システムとしては、例えば微粒子がタンパク質である場合に、質量分析装置に連携させたタンパク質分析システム等の分析装置が一例として挙げられるが、この例に限定されることなく、種々の構成を採用することができる。

【0083】

(第五の実施形態)

本実施形態は、試料中に含まれる特定のタンパク質を分離し、その同定を行うための微粒子処理システムに関する。図8は本実施形態に係るタンパク質の分析手順を示す図である。

【0084】

ステップ101は、細胞や組織、あるいは生体標本等から分析するタンパク質を抽出し、その抽出液を電気泳動に供するのに適した状態の試料に調製する試料調製工程を示している。

【0085】

ステップ102は、第二の実施形態に記載の微粒子操作ユニットを有するチップを使用して、分析するタンパク質をその大きさに応じて分離するステップであ

る。このようなチップとして、たとえば図10に示されるチップを用いることができる。図10に示されるチップについては、後に詳細に説明する。

【0086】

ステップ103は、電気泳動によりタンパク質を分離するステップを示しており、例えば等電点と分子量の違いによりタンパク質を分離する二次元電気泳動やその前処理としてのクロマトグラフィーによる分離もこのステップに含まれる。

【0087】

ステップ104は、プロテアーゼ処理のステップを示しており、プロテアーゼによってタンパク質を加水分解することによりペプチドを含む分解生成物を得る。

【0088】

ステップ105は、ステップ104で得た分解生成物を質量分析に供してペプチドの分子量を決定し、タンパク質の種類を同定するステップを示している。ステップ105には、質量分析に先立ち必要な脱塩等の前処理や、アミノ酸配列やアミノ酸組成等を決定する等の後処理のステップなども含まれる。

【0089】

ここで、微粒子操作ユニットを用いた分離のステップ102を設けていない従来の方法の場合、以下のような課題を有していた。二次元電気泳動は極めて分離能が高いが、二次元電気泳動を行う際にゲルに投入できるタンパク質の総量には限界があった。しかし、タンパク質の発現量は種類によって一定ではないため、発現量の多いタンパク質があると、発現量の少ない微量タンパク質は二次元電気泳動後のスポットには極微量にしか含まれないことになる。この結果、タンパク質が微量であるためにスポットが判別できず、回収が困難であった。また、たとえスポットが判別できたとしても、タンパク質が微量であるため、質量分析の検出限界を下回り、検出不能になってしまっていた。

【0090】

これに対し、本実施形態ではステップ102において、電気泳動に先立ち分離を行う。このとき、第二の実施形態に記載の分離機能を有する図3の微粒子操作ユニットを使用して、発現量の多いタンパク質をその大きさに応じて分離除外す

る。このため、従来の方法についての上述の課題が解決され、発現量の少ないタンパク質の解析が可能となる。また、発現量の多いタンパク質に特に焦点を合わせて分離除外しなくても、タンパク質の大きさにより事前に粗く分離することにより、ゲルへの微量タンパク質の投入量を増加させることができるため、試料不足の問題を緩和することができる。このとき、図3の微粒子操作ユニットを用いれば連続的に分離を行うことができるため、二次元電気泳動の際にゲルに投入するタンパク質の量も容易に確保されるという利点がある。さらに微粒子操作ユニットはゲルを用いずに微細加工技術によって作製されているため、経時的な劣化が少なく、分離の再現性に優れているという利点も有する。

【0091】

また、以上のように図10に示すチップによって分離した試料を二次元電気泳動により分離した後、さらにタンパク質のMALDI-TOFMS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometer: マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置) 用試料調製および測定を行うこともできる。

【0092】

MALDI-TOFMS測定を行うためには、測定対象のタンパク質を、1000Da程度まで低分子化する必要があるため、ステップ104において低分子化を行った後、マトリックス溶液と混合し、乾燥試料とする。

【0093】

まず、測定対象のタンパク質が分子内ジスルフィド結合を有する場合、DTT (ジチオスレイトール) 等の還元試薬を含むアセトニトリル等の溶媒中で還元反応を行う。この還元反応により、次の分解反応が効率よく進行する。なお、還元後、チオール基をアルキル化等により保護し、再び酸化するのを抑制することが好ましい。

【0094】

次に、トリプシン等のプロテアーゼを用いて還元処理されたタンパク質分子の低分子化処理を行う。低分子化は燐酸バッファ等の緩衝液中で行われるため、反

応後、脱塩および高分子画分すなわちトリプシンの除去を行う。そして、MALDI-TOFMSのマトリックスと混合する。

【0095】

その後、濃縮、乾燥を行って、マトリックスと分解されたタンパク質の混合物を析出させる。乾燥後の試料をMALDI-TOFMS装置にセットして電圧を印加し、たとえば337nmの窒素レーザー光を照射し、ステップ105の質量分析を行う。

【0096】

ここで、本実施形態で用いる質量分析装置について簡単に説明する。図14は、質量分析装置の構成を示す概略図である。図14において、試料台上に乾燥試料が設置される。そして、真空下で乾燥試料に波長337nmの窒素レーザーが照射される。すると、乾燥試料はマトリックスとともに蒸発する。試料台は電極となっており、電圧を印加することにより、気化した試料は真空中を飛行し、リフレクター検知器、リフレクター、およびリニア検知器を含む検出部において検出される。

【0097】

したがって、乾燥試料をMALDI-TOFMS装置の真空槽に設置しMALDI-TOFMSを行うことが可能である。

【0098】

なお、MALDI-TOFMS用のマトリックスは、測定対象物質に応じて適宜選択されるが、たとえば、シナピン酸、 α -CHCA (α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸)、2,5-DHB (2,5-ジヒドロキシ安息香酸)、2,5-DHBおよびDHBs (5-メトキシサリチル酸)の混合物、HABA (2-(4-ヒドロキシフェニルアゾ)安息香酸)、3-HPA (3-ヒドロキシピコリン酸)、ジスラノール、THAP (2,4,6-トリヒドロキシアセトフェノン)、IAA (トランス-3-インドールアクリル酸)、ピコリン酸、ニコチン酸等を用いることができる。

【0099】

図10は本実施形態に用いるチップの構成を示す図である。図10のチップは

、本実施形態においてタンパク質の検出に使用される5個の微粒子操作ユニットを1枚の基板上に集積化したタンパク質の分離機能を有する。シリコン基板201上に流路202が形成され、その上に蓋203が接着されている。シリコン基板201への流路202および妨害体の形成においては、狭い間隙をシリコン基板201上に作製する必要があるため、電子線露光装置を使用してリソグラフィを行う。そして、シリコン基板201をドライエッチングした後、熱酸化して円柱状の妨害体の径を増すことにより、間隙を狭めるという加工プロセスを採用することにより作製できる。但し、このような狭いギャップを作製する方法は上記の方法に限らず、例えばガラス基板を加工した後にアルミ薄膜を成膜、酸化するといったような他の加工プロセスも採用できる。

【0100】

また、本実施形態では微細加工の適用性に優れるシリコン基板201を用いたが、シリコンに限らず、高分子樹脂や金属、絶縁体の基板を用いてもよい。また、シリコン基板201と静電接合するため、本実施形態では蓋203の材料にガラスを使用した。接着方法は静電接合には限らず、蓋203の材料、ガラスだけでなく高分子樹脂や金属、絶縁体等が利用可能である。

【0101】

蓋203上には7個の送液用パイプ口204、205、206、207、208、209、および210が設置されており、各々蓋203を貫通して流路202に連通している。流路202には一点鎖線で囲まれた5個の分岐点211、212、213、214、および215が設けられている。

【0102】

各々の分岐点は、図11に模式的に示す構造を取っている。即ち、流路内に複数段からなる円柱状の妨害体の配列が構成されており、タンパク質をその大きさに依存して平面的に分離する機能を有した微粒子操作ユニットとなっている。各種の大きさのタンパク質を含んだ懸濁液は送液用パイプ口204から流路202に流し込まれ、分岐点211から分岐点215を通して、送液用パイプ口205から210に排出される。各分岐点の妨害体の配列は図11に示したように流路202の上流側では間隙の幅 n は広く、下流に行くに従って間隙の幅は m 、1と

狭くなっていく。但し、間隙の幅 ϕ は一定で十分広く取ってある。

【0103】

このような設計により、流路 202 の上流より流れてくるタンパク質は分岐点に容易に侵入し、幅 1 よりサイズの大きいタンパク質は分岐点を幅 1 の間隙を抜けて通過できないため、ブラウン運動と妨害体との衝突等を繰り返しながら、平均的に斜め方向に伸びた流路に流れていく。一方、幅 1 よりサイズの小さいタンパク質は分岐点を幅 1 の間隙を抜けて通過できるため、直線状に流れていきやすい。さらに、斜めに延びた流路側に切れ込んで妨害体の配列が並んでおり、サイズの小さいタンパク質が妨害体の間隙を抜ける確率が高くなる様に流路構造が工夫されている。このような流路の構造で、さらに各パイプ口の送液量を調整する事により十分な分離能でタンパク質をその大きさに従って分離できる。なお、図 11 は模式図であるため 3 段の配列しか描いていないが、実際は 1000 段程度の配列とすることが望ましい。また、間隙の幅も 1、m、n の三種類より細かく分けて作製されていることが望ましい。間隙の幅のうち、n、m、1 は各分岐点 211 から 215 で各々異なり、211 から 215 になるにつれて広がっていくようにする。ただし、n、m、1 の大小関係は各分岐点で変わらない。本実施形態では、例えば分岐点 211 の間隙の幅 1 として 10.0 nm、分岐点 212 の間隙の幅 1 として 12.5 nm、分岐点 213 の間隙の幅 1 として 15.0 nm、分岐点 214 の間隙の幅 1 として 17.5 nm、分岐点 215 の間隙の幅 1 として 20.0 nm と設計することができる。

【0104】

微粒子操作ユニットをこのような構成とすることにより、ほぼ 10 kDa から 100 kDa のタンパク質をその大きさに従って分離することができる。最も小さなタンパク質は分岐点 211 にて分離されパイプ口 206 から排出される。さらにパイプ口 207、208、209、210 と順々により大きなタンパク質が排出される。図 12 はこの様子を描いた模式図である。図 12 において、分岐点 211 で分離され、パイプ口 206 にて排出されるタンパク質は、例えばタンパク質の大きさと通過確率で囲まれる領域 216 で示される。さらにパイプ口 207、208、209、210 から排出されるタンパク質は、各々領域 217、2

18、219、220で示される。

【0105】

以上のチップによる粗精製ステップをゲルによる二次元電気泳動の前処理として挿入すると、ゲル上の分離したタンパク質のスポットにおいて、その中のタンパク質の濃度を増加させることができる。図13は二次元電気泳動により分離したタンパク質のスポットの様子を示す模式図である。図13(a)は従来の前処理として粗精製ステップを行わない場合を示しており、図13(b)は前処理として粗精製ステップを行った場合を示している。図13(a)に示されるように、横軸は等電点による分離を示しており、縦軸は分子量による分離を示している。分離されたタンパク質のスポットは、例えば図13(a)中のスポット221aの様に二次元マップ上に現れる。

【0106】

二次元電気泳動においては、一回の分離においてゲルに投入できるタンパク質の総量は100 μ g程度に限られているため、通常スポットに含まれるタンパク質の濃度には限界がある。しかしながら、二次元電気泳動の前処理として図10のチップを使用して粗精製を行うと、図12のように分子量と相関のあるタンパク質の大きさに従って、タンパク質試料を5分割できる。従って、分割したタンパク質試料を各々100 μ gずつ5枚のゲルに投入することにより、図13(b)の様にタンパク質のスポットを有する5枚のゲルが得られる。これらのスポットは一点鎖線で示した領域222から226に各々集中して現れる。図13(a)の従来の場合と比較して、これらのスポットは各々ほぼ5倍の量のタンパク質を含む。従って、例えばスポット221aから収集できるタンパク質の量があまりに微量であるために、質量分析装置の検出感度を下回っていた場合においても、スポット221bの場合には質量分析装置で検出することが可能となる場合がある。

【0107】

以上図10のチップを用いて分離した試料を用いた場合を例に説明をしたが、その他の実施形態に記載の微粒子操作ユニットを含むチップを用いることももちろん可能である。

【0108】

また、以上においてはステップ105においてタンパク質の質量分析を行う場合を例に説明したが、シーケンサーなどを用いた分析等を行う場合にも、本実施形態に係る微粒子操作ユニットによる前処理が適用可能である。また、本実施形態において使用する微粒子操作ユニットは、第二の実施形態に記載の構成に限定されるものではなく、その他の態様とすることも可能である。

【0109】

(第六の実施形態)

本実施形態は、試料中に含まれる特定のタンパク質を分離し、その同定を行うための微粒子処理システムの別の一例に関する。図9は本実施形態に係るタンパク質の分析手順を示す図である。

【0110】

図9において、ステップ106は細胞や組織、あるいは生体標本等から分析対象となるタンパク質を抽出し、その抽出液をプロテインチップにより精製するのに適した状態の試料に調製する試料調製ステップを示している。

【0111】

ステップ107は、第二の実施形態に記載の図3の微粒子操作ユニットを使用して、分析するタンパク質をその大きさに応じて分離するステップである。

【0112】

ステップ108は、ステップ107で粗精製され、分離されたタンパク質をプロテインチップ上に添加し、チップ上に固定化された被吸着物質に親和性のあるタンパク質のみを分離するステップを示している。

【0113】

ステップ109は、洗浄ステップを示しており、プロテインチップ上に残留している塩等の不純物や親和性を有しない物質を水や緩衝液により洗い流して除去するステップである。

【0114】

ステップ110は、ステップ109を経てプロテインチップ上に残留した親和性のあるタンパク質を質量分析に供して分子量を決定し、タンパク質の種類を同

定するステップを示している。

【0115】

ここで、粗精製のステップ107でスピнкаラムを使用していた従来の方法の場合、以下のような問題点を有していた。プロテインチップは比較的分子量の小さい25KDa以下のタンパク質の感度が高い。このため、前処理としてスピнкаラムによる粗精製が行われていた。ところが、粗精製にスピнкаラムを使用した場合、精製後のタンパク質の量がプロテインチップに投入するのに不足していた場合には、再度スピнкаラムによる粗精製を行わなければならなかった。従って、処理操作が煩雑であり、自動化等にも支障をきたしていた。

【0116】

これに対し本実施形態では、粗精製のステップ107において図3の微粒子操作ユニットを使用することにより、スピнкаラムで間欠的にしか行うことができなかった粗精製ステップを連続的に行っている。従って、プロテインチップに必要とするタンパク質の量に達するまで目的のタンパク質を連続的に収集できる。このため、ステップの自動化にも好適である。また、この微粒子操作ユニットはチップ上に搭載できるため、プロテインチップと同一のチップ上に集積化することもできる。この場合には、操作する人間の手間が省けるだけでなく、ステップ107からステップ108の間の試料の損失を最小限に抑えることができる。従って、タンパク質の検出方法全体としても、高感度化を実現できるという産業上の利点を有する。

【0117】

なお、本発明は上記の実施形態に限定されず、本発明の技術思想の範囲内において、適宜変更され得ることは明らかである。

【0118】

以下、本発明を実施例によりさらに説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0119】

【実施例】

本実施例では、図11を用いて前述した微粒子操作ユニットの分岐流路の方向

が左右逆転した構成の微粒子操作ユニットをチップ上に作製し、評価した。図 15 は、本実施例に係るチップの概略構成を示す上面図である。チップ 245 では、基板 231 上に、流路 233 および流路 235 からなる主流路と、流路 237 が形成されている。流路 233、流路 235、および流路 237 のそれぞれに、液溜め 239、液溜め 241、および液溜め 243 が連通している。また、流路 233、流路 235、および流路 237 は図中に点線で示される分岐点 247 にて連通している。また、液溜め 239、液溜め 241、および液溜め 243 は、それぞれ白金線（不図示）の挿入により形成された電極（不図示）を有する。

【0120】

本実施例において、微粒子操作ユニットの作製には、第五の実施の形態に記述した加工方法を用いた。図 16 は、作製した微粒子操作ユニットの分岐点 247 を示す顕微鏡写真である。分岐流路の方向が左右逆転しているが、図 11 に模式的に示した微粒子操作ユニットに対応する構成となっていることがわかる。なお、図 16 において、流路 233 および流路 235 の流路幅は $40\ \mu\text{m}$ とした。また、図中の妨害体領域に、妨害体の配列を 1000 段程度形成した。

【0121】

図 17 は、分岐点 247 の上流側の走査電子顕微鏡像である。図中の白い点の一つ一つが妨害体 8 である。妨害体 8 の間隙は分岐点下流側に向かって徐々に狭くなっている。さらに図 17 は分岐点の下流側であって、流路 237 に面した部分の走査電子顕微鏡像である。図 11 の 1 に当たる妨害体 8 の間の間隙は約 $32\ \text{nm}$ であり、n に相当する間隔は $150\ \text{nm}$ である。一方、図 11 の o に相当する間隔は約 $150\ \text{nm}$ である。図 18 は、妨害体領域に形成された妨害体 8 の配列構造を拡大した電子顕微鏡写真である。

【0122】

本実施例では、微粒子操作ユニットを用いることにより、以下に記載する DNA の操作を行った。

【0123】

バッファ液を満たした流路中で、蛍光染色した DNA を電気泳動し、観察した。電気泳動の際には、流路 233 に $-5\ \text{V}$ 、流路 235 に $18\ \text{V}$ 、流路 237 に

1. 5 Vの電圧をそれぞれ印加した。

【0124】

図19は、図16と同一位置で観察した、100bpのDNAを電気泳動した場合の蛍光顕微鏡写真である。図19において、白い一点一点が各々蛍光染色されたDNAに相当する。ほとんどのDNAは流路237には泳動せず、多くは約32nmの間隙を通過して流路235に流れている。なお、P. G. Righetti著、「Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology」, 1996 CRC Press, Inc., p. 480によると、DNAの慣性半径は、下記式(1)によって算出される。

【0125】

【数1】

$$\langle r^2 \rangle = \frac{1}{12} b^2 \left(\frac{2N}{330} - 1 + e^{\frac{-2N}{330}} \right) \quad (1)$$

(ただし、上記式(1)において、 r は慣性半径であり、 b はKuhn長であり、100nmである。また、 N はDNAの塩基対の数である。)

【0126】

上記式(1)を用いて算出した慣性半径を用いると、100bpのDNAの慣性半径から算出した粒径は約22nmであり、本実施例の印加電圧条件下におけるバッファ液中での変形のしやすさを考慮したDNAの粒径はさらに小さくなるため、約32nmの間隙を通過している。

【0127】

また、図20は、300bpのDNAを同じ印加電圧の条件で電気泳動した場

合の蛍光顕微鏡写真を示す図である。DNAは約32 nmの間隙を通ることなく流路237に流れている。なお、300 bpのDNAの慣性半径から算出した粒径は、上記式(1)より約57 nmであり、本実施例の印加電圧条件下におけるDNAの変形のしやすさを考慮した粒径よりも十分大きく、約32 nmの間隙を通過することはできない。

【0128】

以上示した通り、本実施例においては、DNAの大きさに従って流動方向を操作可能な微粒子操作ユニットが実現されている。なお、本実施例の微粒子操作ユニットを用いて、これらのDNAの分離を行うこともできた。

【0129】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明によれば、マイクロ流路内で液体中の微粒子の流れを操作する微粒子操作ユニット、それを搭載したチップと検出装置、およびタンパク質の分離、捕獲、検出方法が実現される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本実施形態に係る微粒子操作ユニットの構成の一例を示す斜視図である。

【図2】

図1の微粒子操作ユニットの分岐点に設けられた妨害体と、分岐点の上流に存在する微粒子を示す上面図である。

【図3】

本実施形態に係る微粒子操作ユニットの構成の一例を示す斜視図である。

【図4】

図3の微粒子操作ユニットの分岐点に設けられた妨害体と、分岐点の上流に存在する微粒子を示す上面図である。

【図5】

本実施形態に係る微粒子操作ユニットの構成の一例を示す斜視図である。

【図6】

図5の微粒子操作ユニットに設けられた妨害体および微粒子を示す上面図であ

る。

【図 7】

本実施形態に係る微粒子操作ユニットの構成の一例を示す上面図である。

【図 8】

本実施形態に係るタンパク質の分析手順を示す図である。

【図 9】

本実施形態に係るタンパク質の分析手順を示す図である。

【図 10】

本実施形態に係るチップの構成の一例を示す図である。

【図 11】

本実施形態に係る微粒子操作ユニットの分岐点に設けられた妨害体の構成を示す斜視図である。

【図 12】

本発明の実施例を説明する、タンパク質の分離状況の一例を示す模式図である。

【図 13】

実施例において二次元電気泳動により分離したタンパク質のスポットの様子を示す模式図である。

【図 14】

質量分析装置の構成を模式的に示す図である。

【図 15】

実施例のチップの概略構成を示す上面図である。

【図 16】

実施例のチップの分岐点の構成を示す図である。

【図 17】

実施例のチップの妨害体領域の構成を示す図である。

【図 18】

実施例のチップの妨害体領域の構成を示す図である。

【図 19】

実施例の微粒子操作ユニットに100bpのDNAを電気泳動した様子を示す図である。

【図20】

実施例の微粒子操作ユニットに300bpのDNAを電気泳動した様子を示す図である。

【符号の説明】

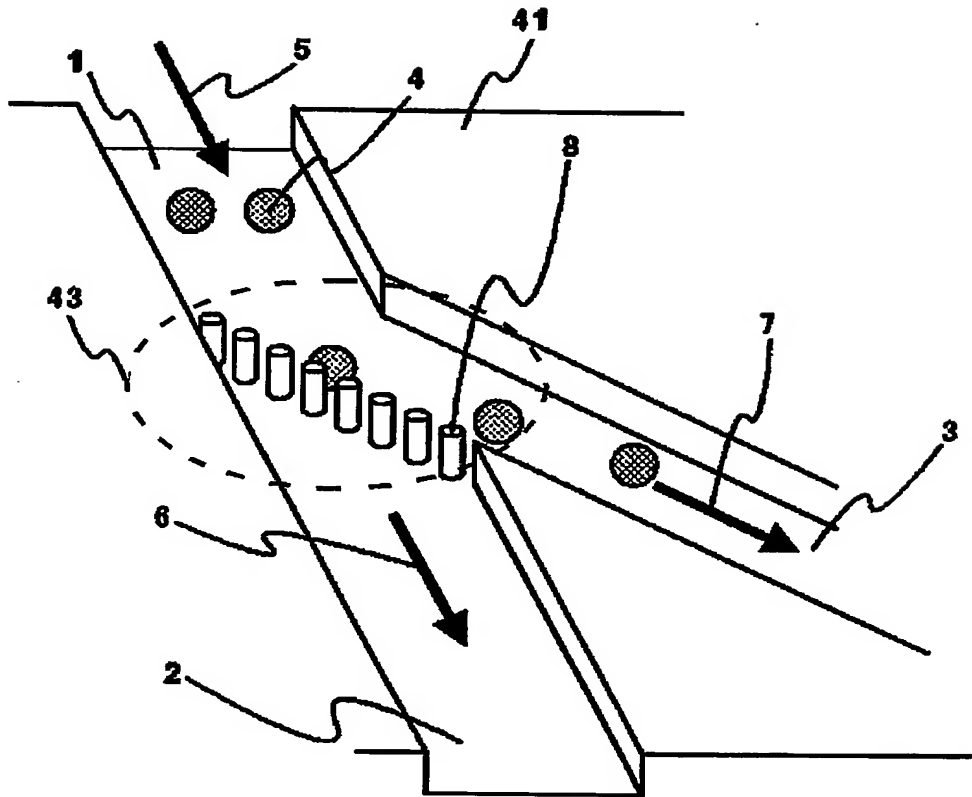
- 1～3、14、20～25 流路
- 4、13、15、26 微粒子
- 5～7、16、27～32 矢印
- 8、33 妨害体
- 9 線分
- 10 力の方向
- 11 角度
- 12 単位胞
- 17、17a、17b トレンチ構造
- 18、19 一点鎖線
- 41、47 基板
- 43 分岐点
- 45 流路拡張部
- 201 シリコン基板
- 202 流路
- 203 蓋
- 204～210 送液用パイプ口
- 211～215 分岐点
- 216～220 領域
- 221a、221b タンパク質のスポット
- 222～226 領域
- 231 基板
- 233 流路

2 3 5 流路
2 3 7 流路
2 3 9 液溜め
2 4 1 液溜め
2 4 3 液溜め
2 4 5 チップ
2 4 7 分岐点

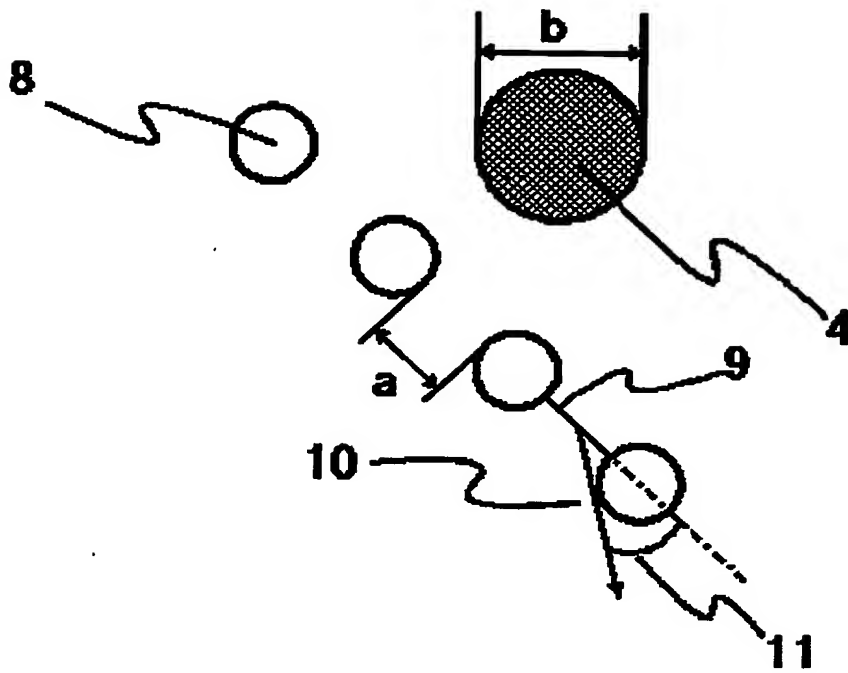
【書類名】

図面

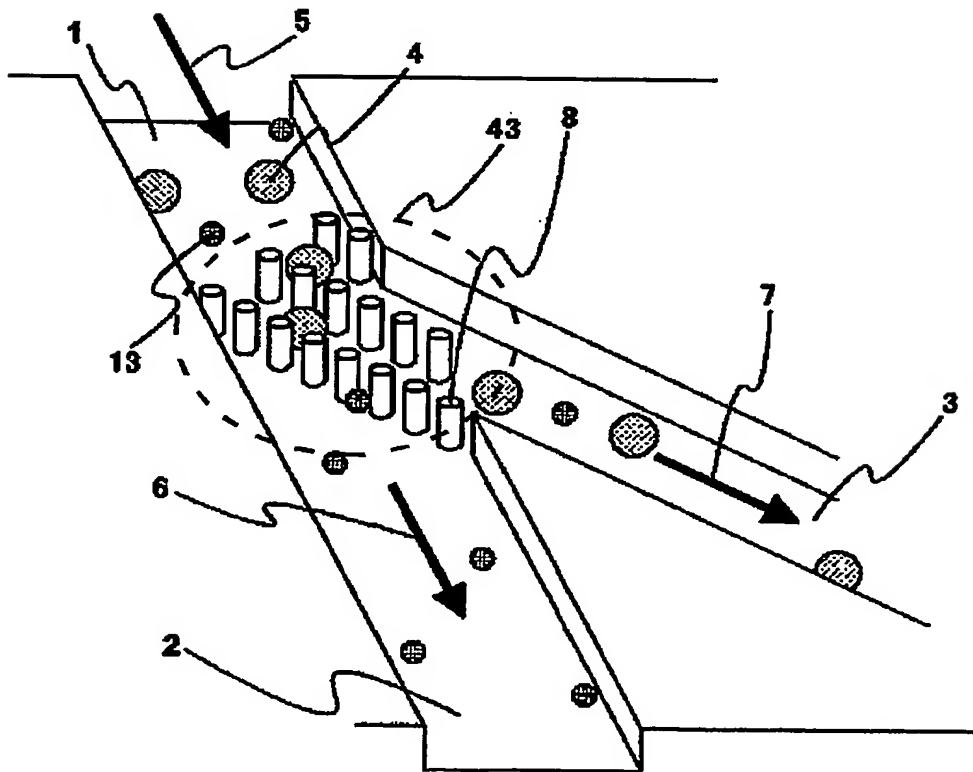
【図 1】



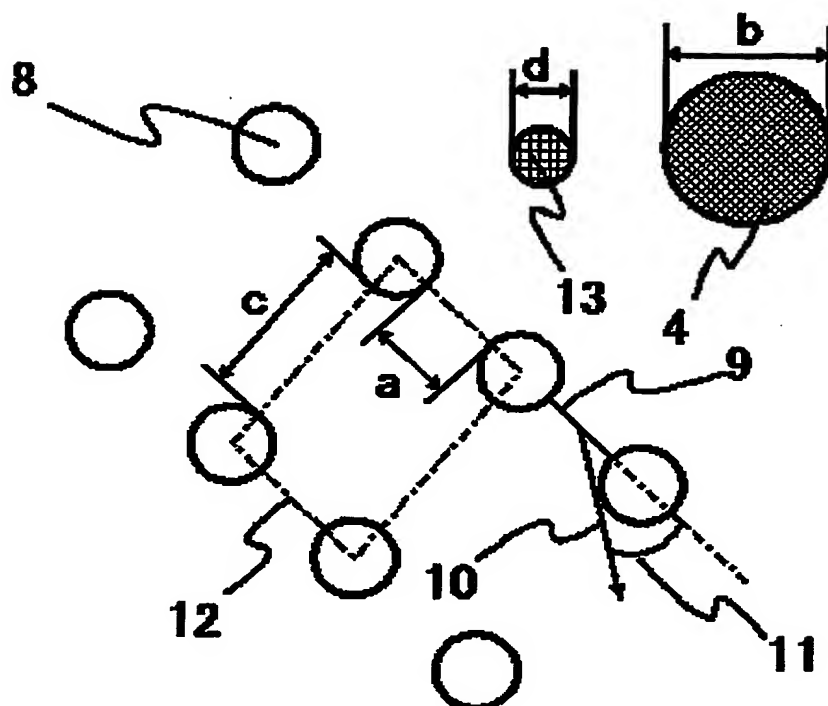
【図 2】



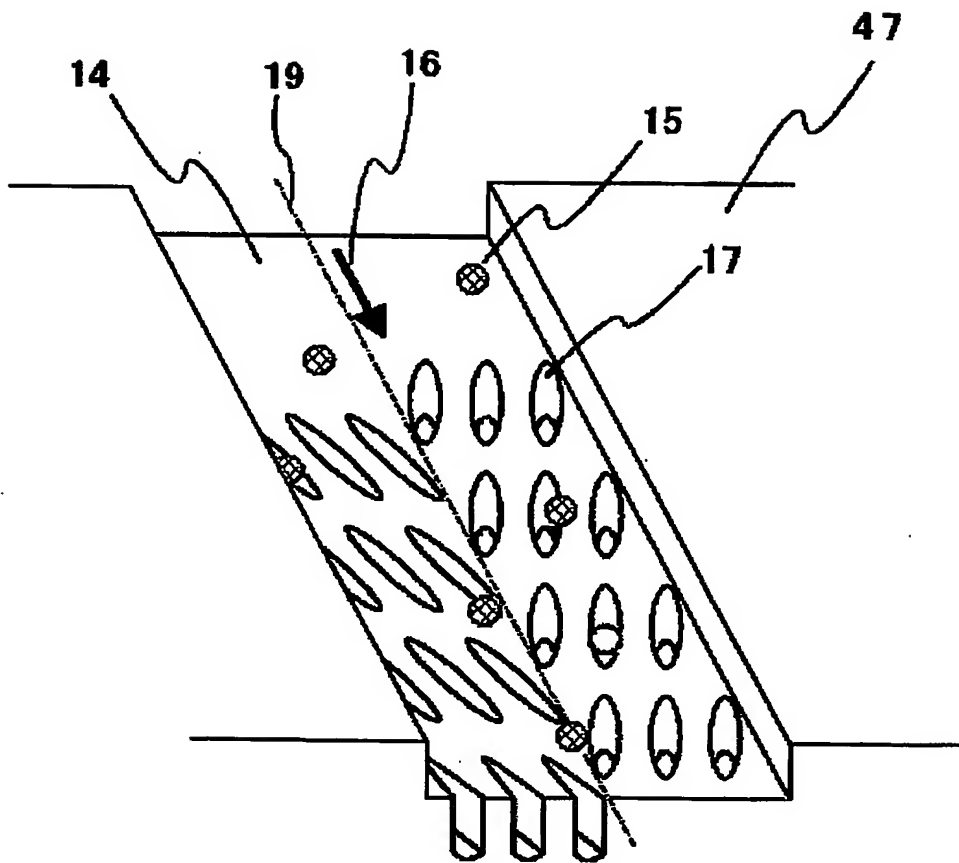
【図 3】



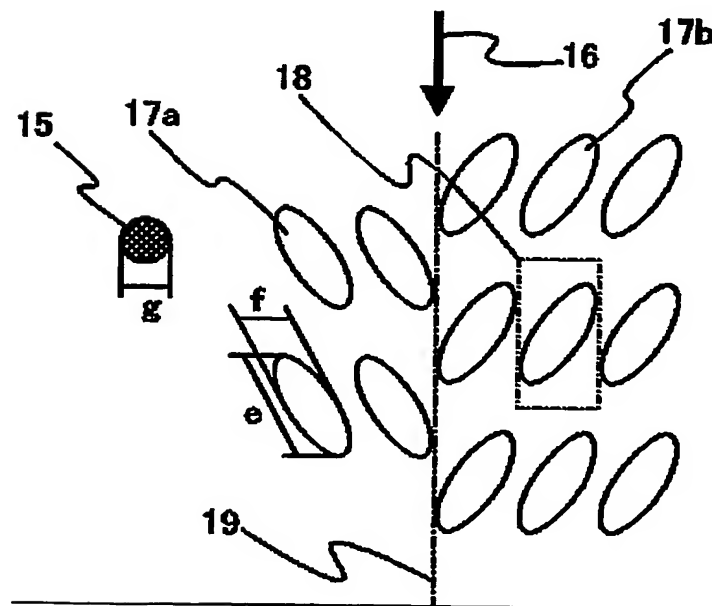
【図 4】



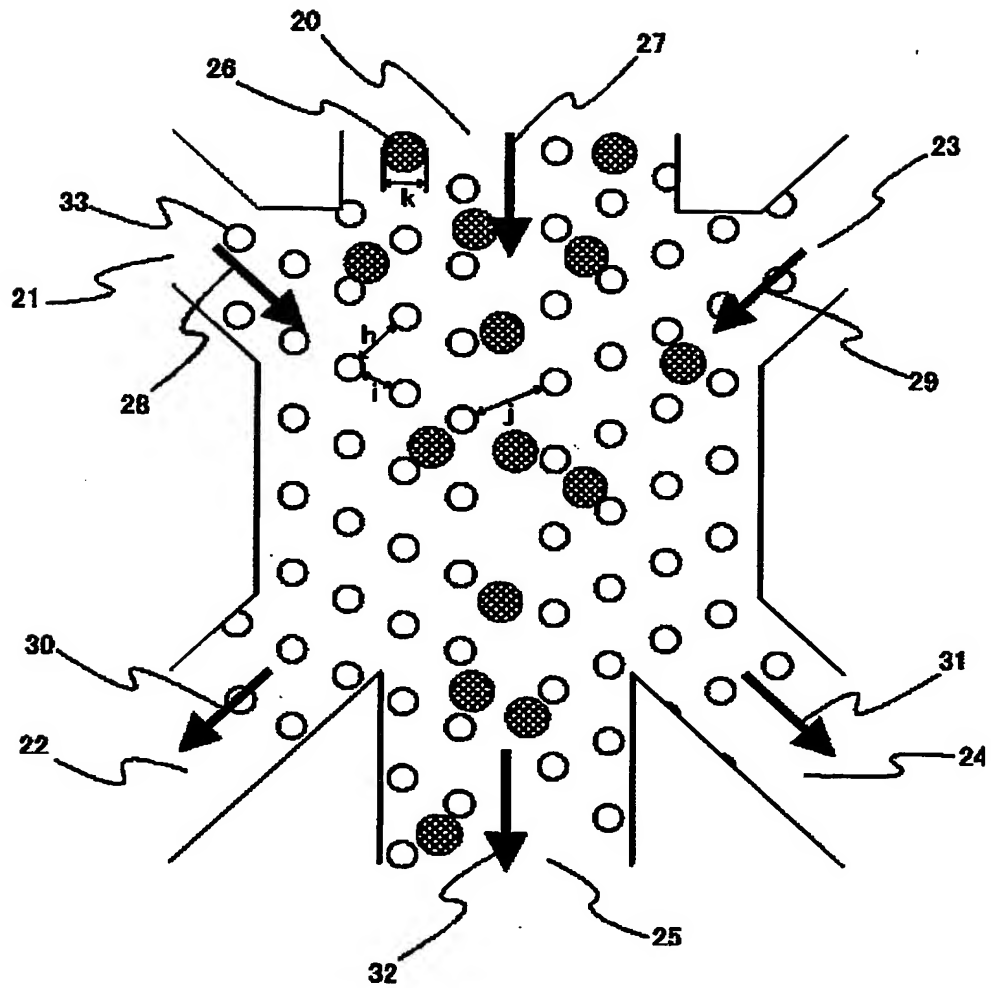
【図 5】



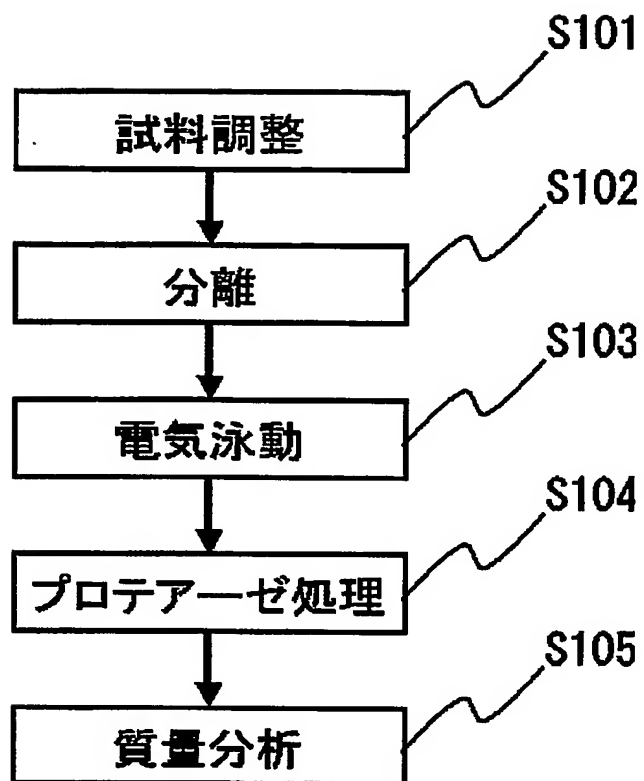
【図 6】



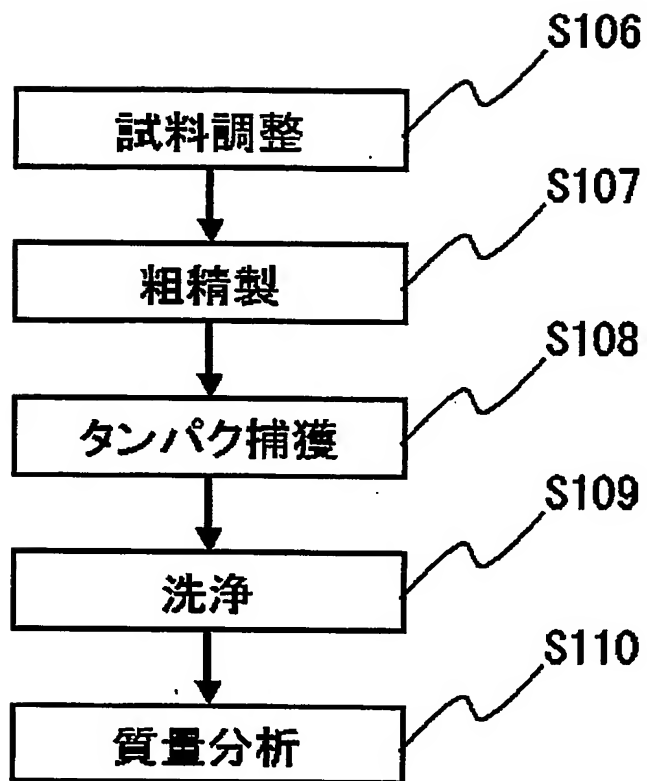
【図 7】



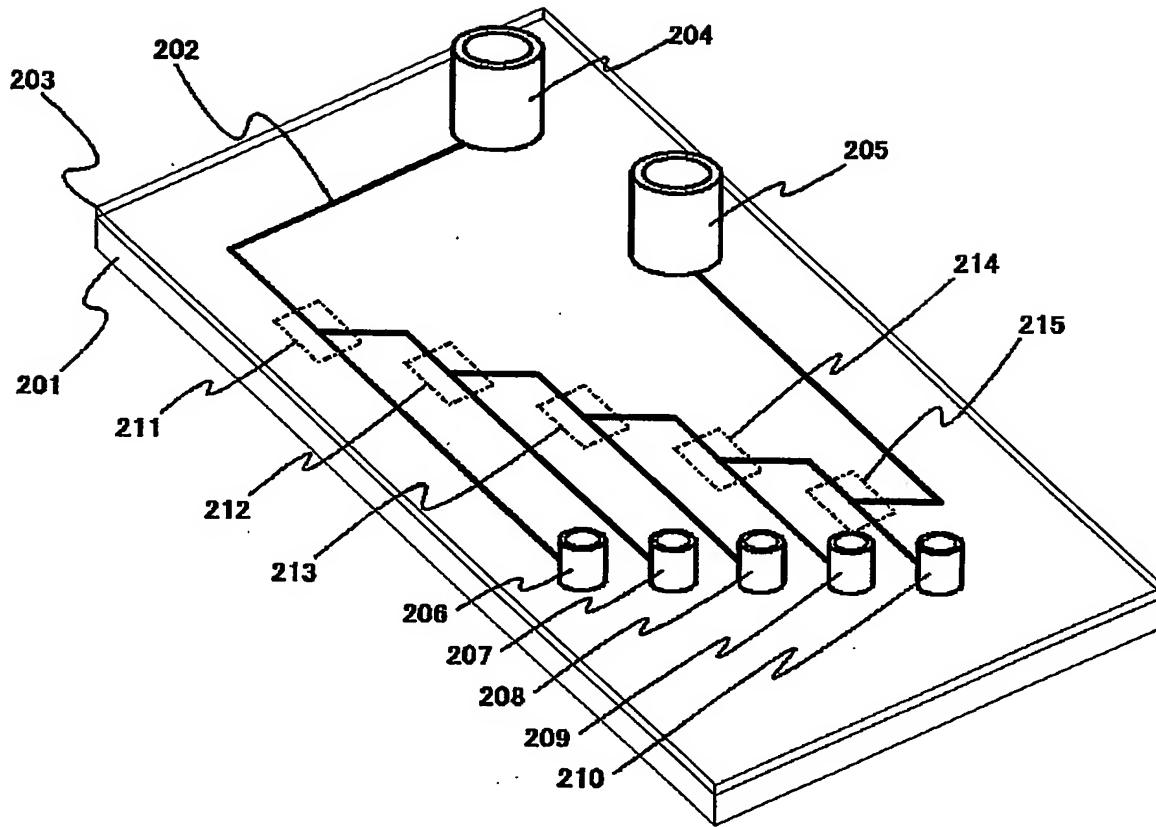
【図 8】



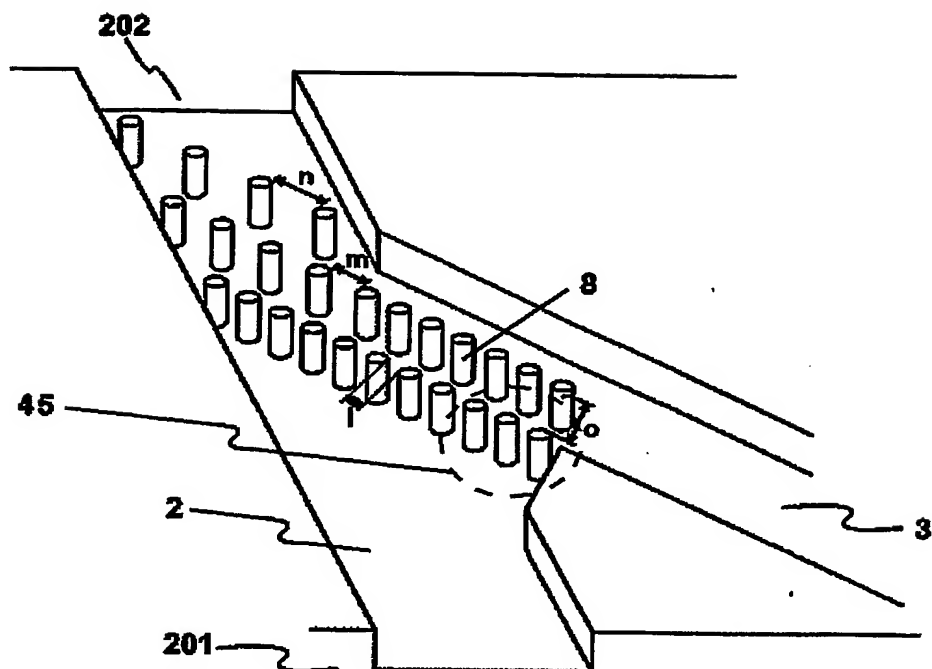
【図 9】



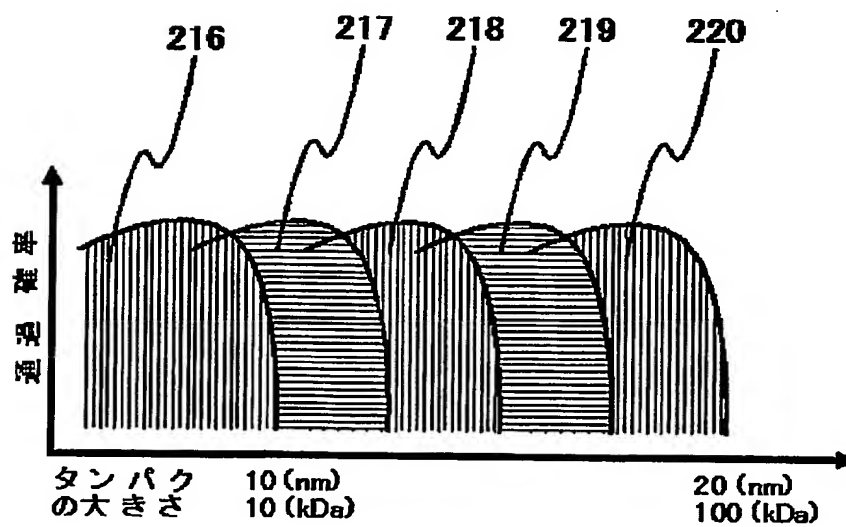
【図 10】



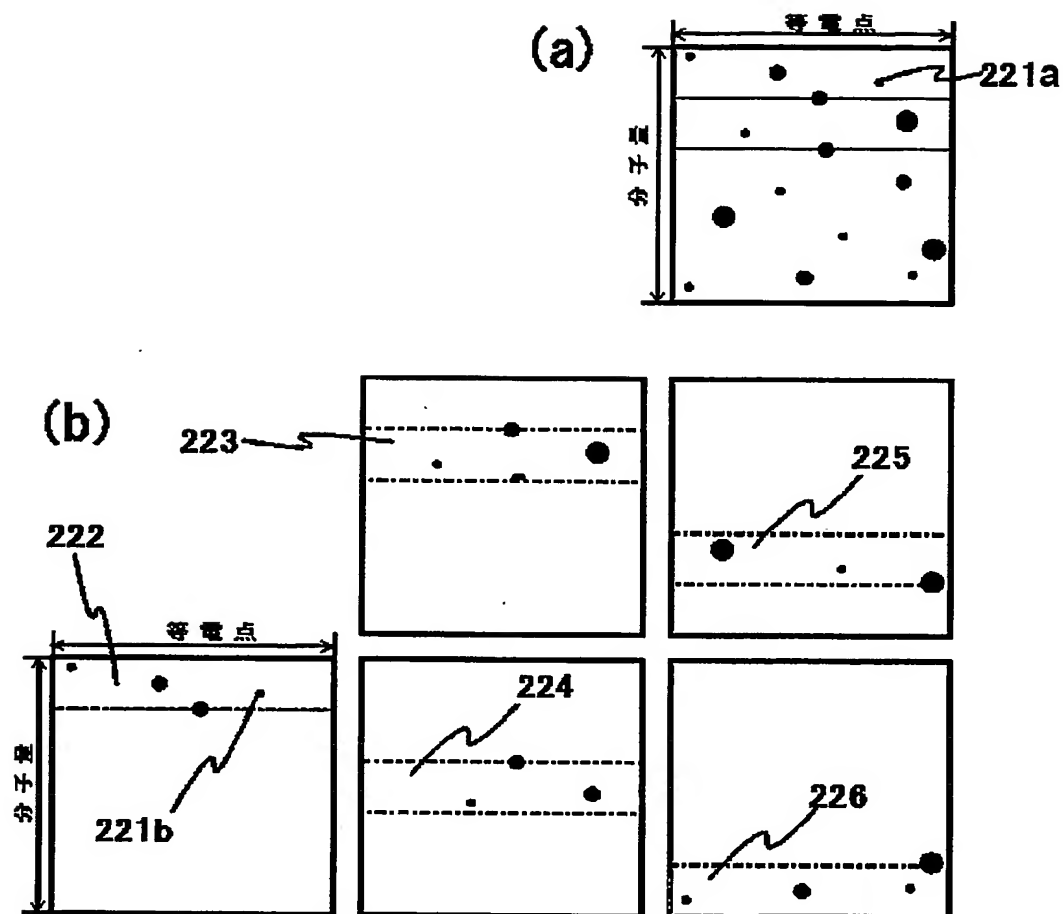
【図 11】



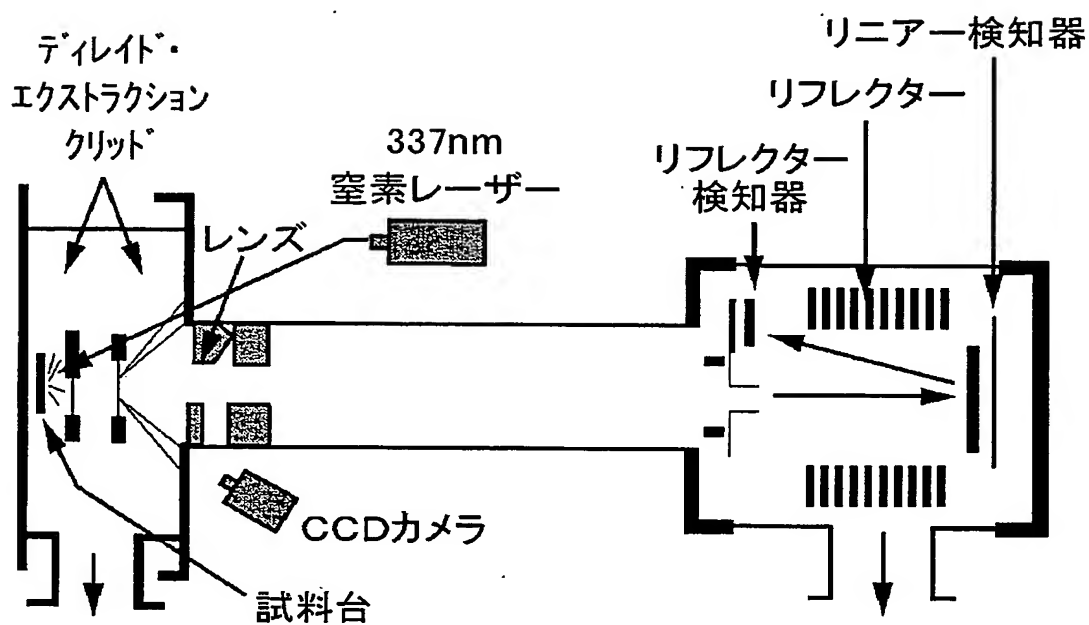
【図 12】



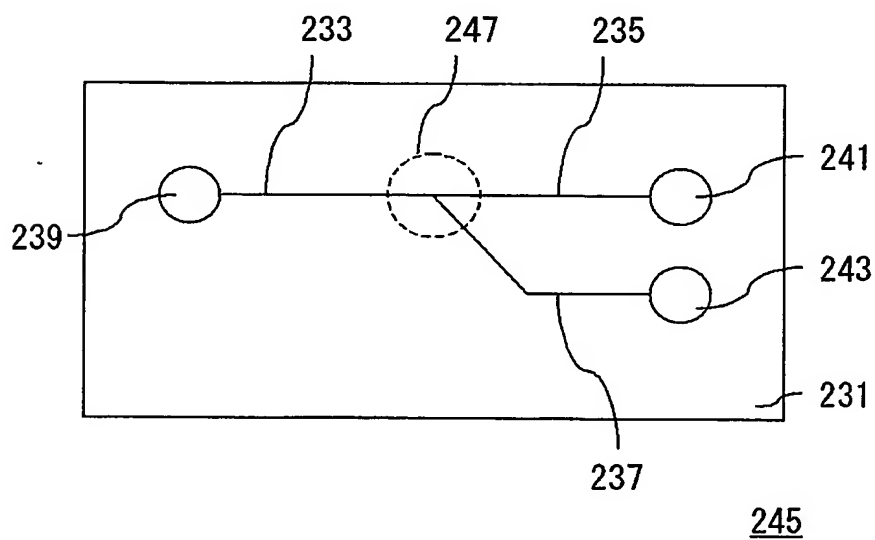
【図 13】



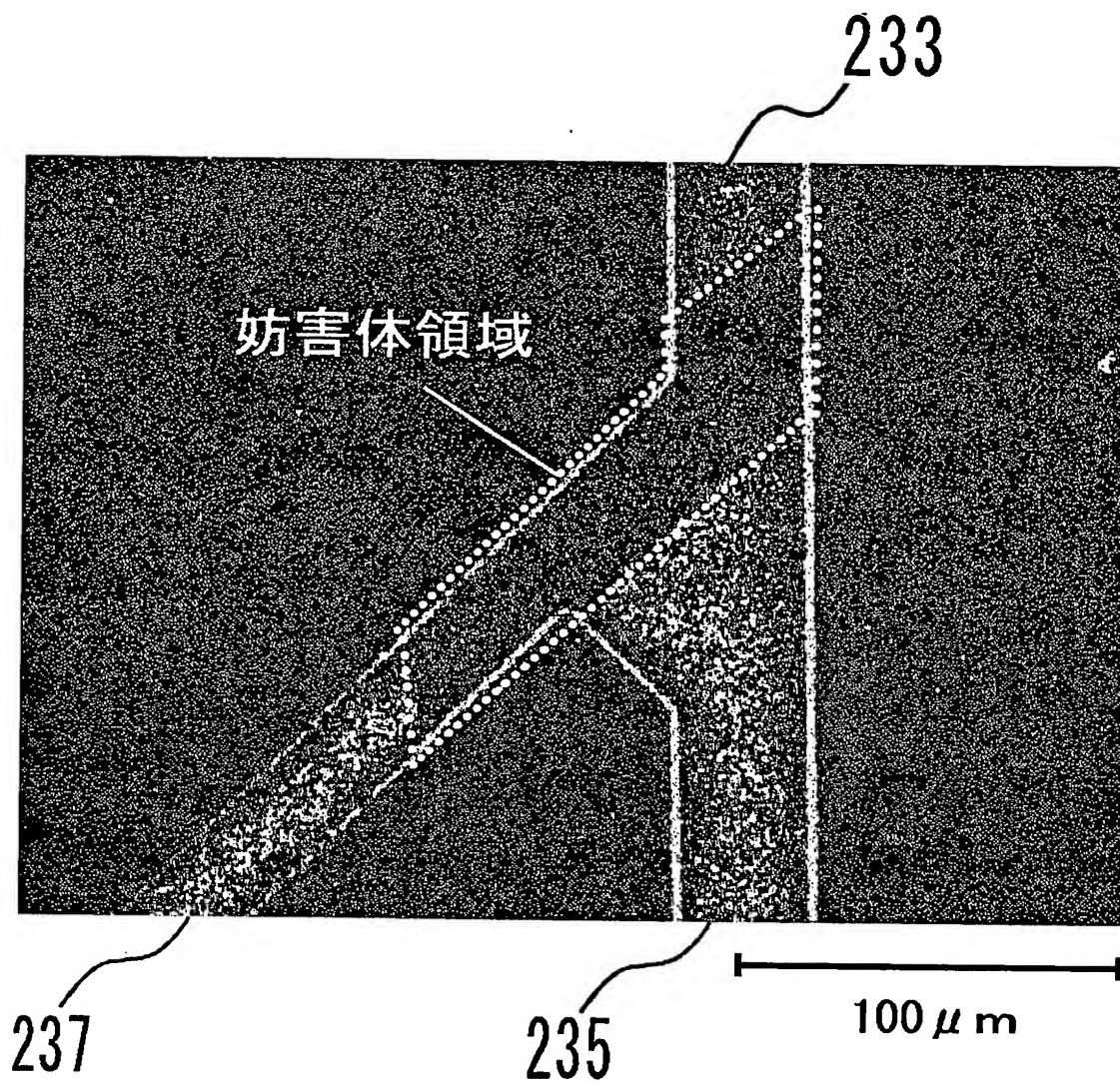
【図 14】



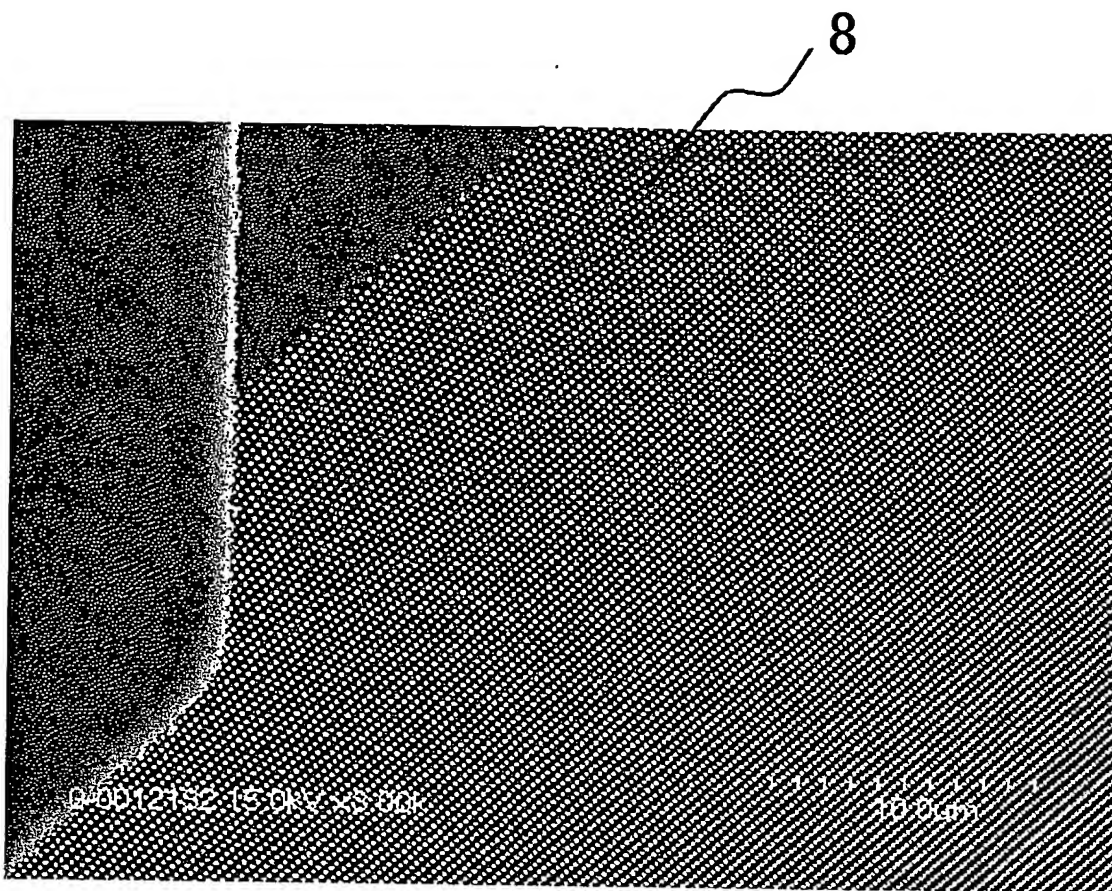
【図 15】



【図 16】

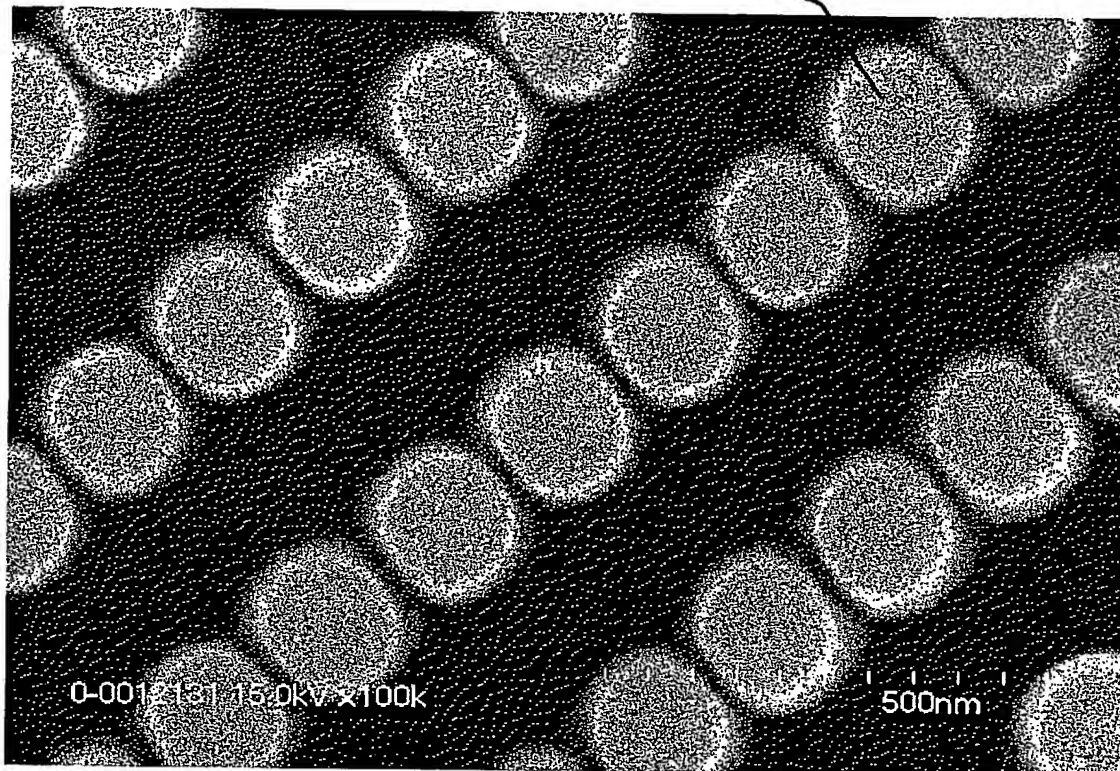


【図 17】

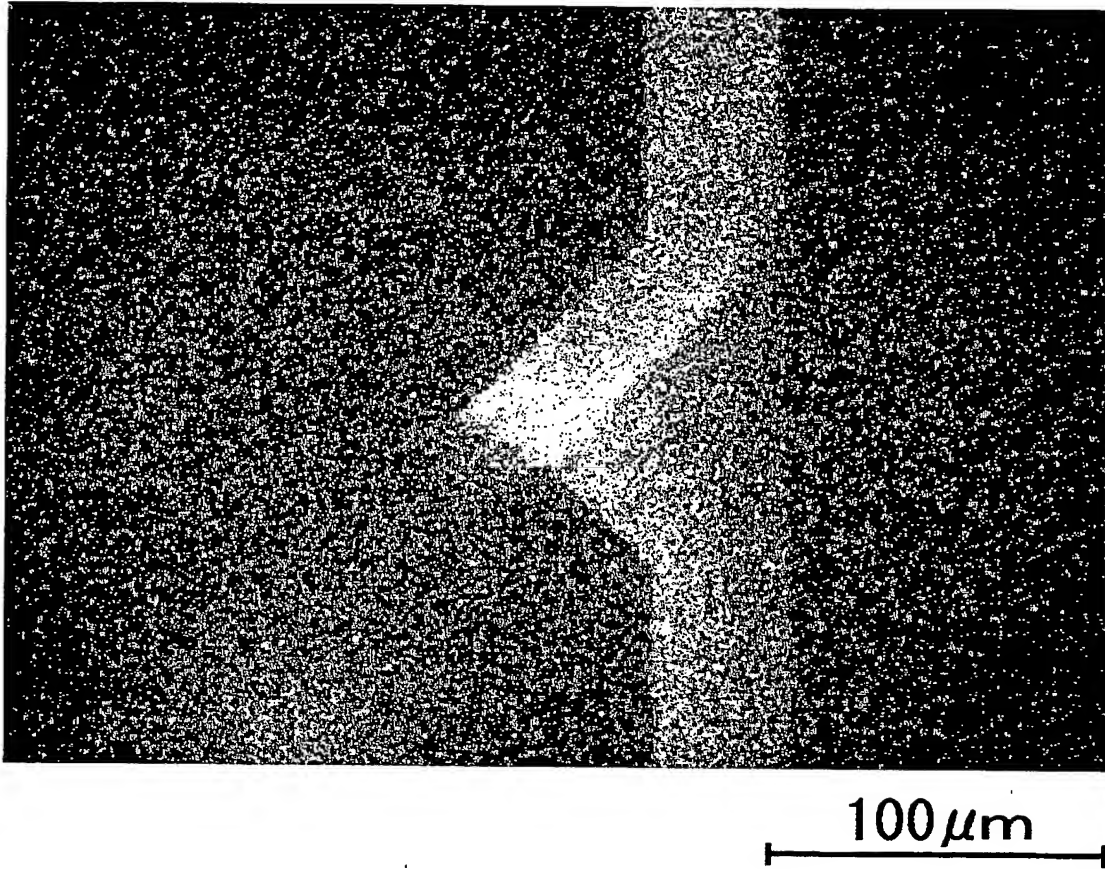


【図 18】

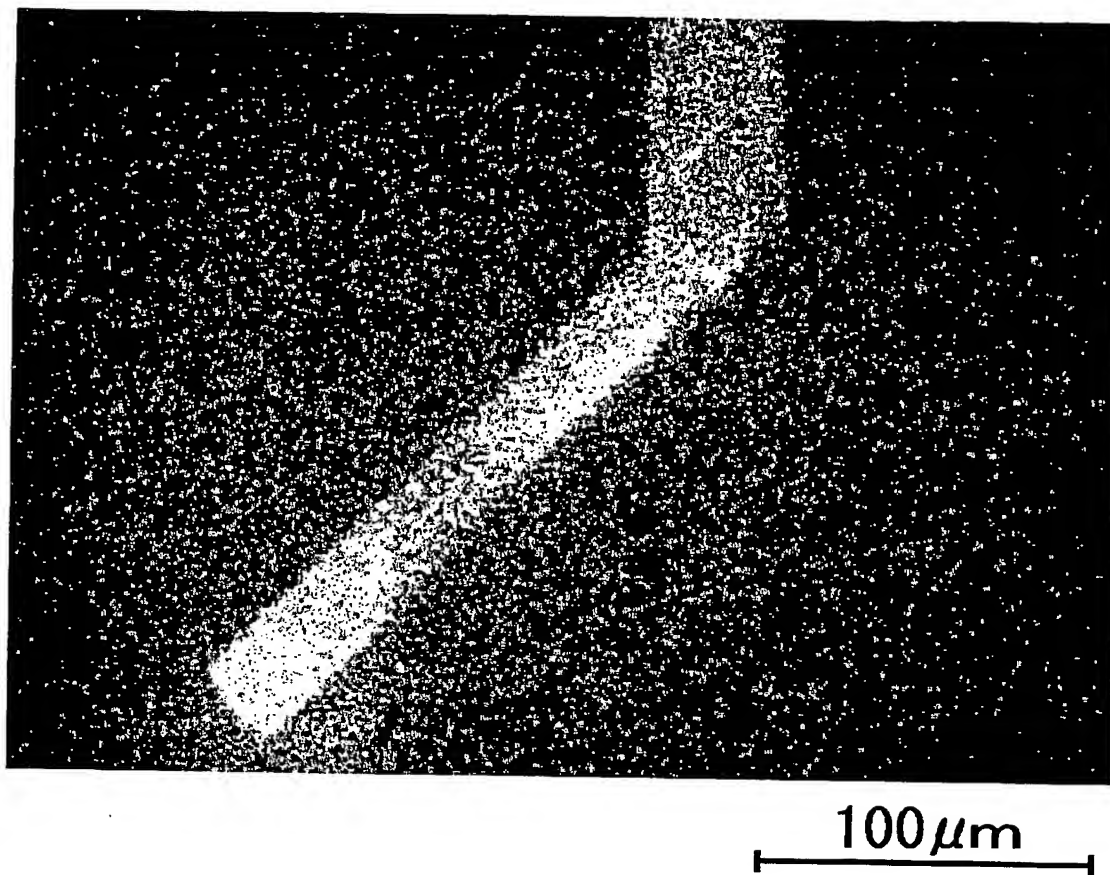
8



【図 19】



【図 20】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 マイクロ流路内で液体中の微粒子の流れを操作する微粒子操作ユニット、それを搭載したチップと検出装置、およびタンパク質の分離、捕獲、検出方法を提供する。

【解決手段】 基板 4 1 上に形成された流路 1 が分岐点 4 3 において流路 2 と流路 3 とに分岐する構成とする。そして、流路 1 と流路 2、及び流路 3 の分岐点には、柱状構造の妨害体 8 を一定の間隙を設けて配列する。

【選択図】 図 1

特願 2003-130834

出願人履歴情報

識別番号

[000004237]

1. 変更年月日

1990年 8月29日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都港区芝五丁目7番1号

氏 名

日本電気株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.